



Intérêt des cellules souches mésenchymateuses dans la thérapie du glaucome

Christophe Roubéix

► To cite this version:

Christophe Roubéix. Intérêt des cellules souches mésenchymateuses dans la thérapie du glaucome. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066535 . tel-01134389

HAL Id: tel-01134389

<https://theses.hal.science/tel-01134389>

Submitted on 23 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THÈSE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité
Physiopathologie

Ecole doctorale: Physiologie et Physiopathologie

Présentée par

Christophe ROUBEIX

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**Intérêt des cellules souches mésenchymateuses
dans la thérapie du glaucome**

soutenue le 18 décembre 2014

devant le jury composé de :

Dr Françoise BRIGNOLE-BAUDOUIN Directrice de thèse

Dr Luc SENSEBE Rapporteur

Pr Eric GABISON Rapporteur

Pr Michel PAQUES Président du Jury

Pr Christophe BAUDOUIN Examineur

Dr Patrick Jean Marie PHILIP Examineur

Dr Xavier GUILLONNEAU Examineur

RESUMÉ

Le glaucome est une neuropathie optique associée à une augmentation de la pression intraoculaire (PIO). L'élévation de la PIO est due à la dégénérescence progressive du trabéculum. L'arsenal thérapeutique que composent les traitements antiglaucomateux vise à réduire la PIO, cependant il n'existe aucun traitement ciblant directement l'intégrité fonctionnelle du trabéculum. Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) sont aujourd'hui utilisées comme outils thérapeutiques dans différentes pathologies dégénératives. Elles sécrètent un large panel de molécules dont des facteurs trophiques qui sont décrits comme pouvant atténuer ou ralentir les processus dégénératifs.

L'objectif de ce travail a été d'évaluer l'intérêt de l'utilisation des CSMs dans la prise en charge du glaucome. L'isolement et la caractérisation des CSMs ont été mis au point à partir de culture primaire de moelle osseuse de rat. En parallèle, un modèle expérimental de glaucome par cautérisation des veines épiscclérales (EVC) a été réalisé afin de tester l'effet de la greffe de CSMs sur la PIO. Dans une démarche de preuve de concept et d'étude préclinique d'efficacité, nous nous sommes intéressés à l'effet des CSMs sur le trabéculum et sur la PIO.

Nous avons déterminé les paramètres de la thérapie cellulaire en terme de modalités d'injection des cellules, de concentration cellulaire et de distribution des cellules dans la chambre antérieure de l'œil. Les CSMs sont retrouvées 23 jours après injection, incorporées aux tissus autour et dans le trabéculum. Les résultats obtenus *in vivo* montrent un effet favorable des CSMs en réduisant l'augmentation de la PIO induite par le modèle d'EVC. L'analyse par immunohistochimie des cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs) met en évidence la conservation de la densité cellulaire périphérique chez les animaux traités par l'injection des CSMs. Ainsi, nous montrons que l'injection des CSMs intracaméculaire d'un modèle de glaucome préserve la fonction du trabéculum et protège les CGRs. Par une approche *in vitro*, nous avons également caractérisé les effets de l'ensemble des facteurs sécrétés par les CSMs sur les cellules résidentes impliquées dans la pathologie glaucomateuse: les cellules trabéculaires et les cellules ganglionnaires de la rétine.

Ces résultats ont permis de montrer, d'une part, que l'injection intracaméculaire de CSMs permettrait de protéger la fonction de régulation de la PIO, et, d'autre part, de protéger les CGRs dont la mort est responsable de la diminution de l'acuité visuelle chez le patient glaucomateux.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	1
GÉNÉRALITÉS.....	4
I. La thérapie cellulaire:.....	5
I.1. Définition.....	5
I.2. Historique.....	6
I.3. Principes généraux.....	7
I.4. Différents types cellulaires utilisés.....	7
I.4.1. En fonction de leur origine.....	7
I.4.2. En fonction de leur plasticité.....	8
I.5. Les commissions de vigilance.....	9
I.6. La biovigilance.....	10
II. Les cellules souches.....	13
II.1. Généralités sur les cellules souches.....	13
II.2. Les cellules souches mésenchymateuses.....	15
II.2.1. Identification.....	17
II.2.2. Localisation.....	18
II.2.3 Rôle physiologique.....	20
II.3.1. Rôle de cellule souche.....	20
II.3.2. Rôle dans les niches de la moelle osseuse.....	20
II.3.3. Rôle sur l'immunité.....	24
II.4 Caractéristiques et mécanismes d'action.....	26
II.4 1. La transdifférenciation.....	26
II.4.2. L'activité paracrine.....	26
II.4.2.1. Stimulation de l'angiogénèse.....	27
II.4.2.2. Effet neuroprotecteur.....	28
II.4.2.3. Stimulation de prolifération des cellules souches endogènes.....	30
II.4.3.Immunomodulation.....	31

III. Les CSMs et leurs applications thérapeutiques dans les pathologies

oculaires.....	34
III.1. CSMs et dégénérescence rétinienne.....	36
III.2. CSMs et glaucome.....	40
III.2.1. Généralités sur le glaucome primitif à angle ouvert.....	40
III.2.1.1. La physiopathologie.....	40
III.2.1.2. La prise en charge.....	41
III.2.2. Revue de l'utilisation des CSMs dans le glaucome.....	42
III.3. CSMs et atteintes cornéennes.....	44
III.3.1. Insuffisance limbique et reconstruction cornéenne.....	44
III.3.2. Atteintes cornéennes superficielles et profondes.....	45
III.3.3. Greffe cornéenne.....	47
III.3.4. Sécheresse oculaire.....	48
III.4. CSMs et uvéites.....	49

IV. Méthodes d'optimisation de la thérapie cellulaire avec les CSMs.....

IV.1. Paramètres généraux de thérapie cellulaire.....	53
IV.2.1. Quantité de cellules à injecter.....	53
IV.2.2. Voies d'administration des cellules.....	53
IV.2. Paramètres spécifiques des CSMs.....	54
IV.2.1. Optimisation de l'effet immunomodulateur.....	54
IV.2.2. Optimisation de la survie.....	56
IV.2.2.1. Prétraitement hypoxique.....	56
IV.2.2.2. Prétraitement à la mélatonine.....	56
IV.2.3. Modification génétique.....	57
IV.3. Biomatrices.....	58

RESULTATS EXPERIMENTAUX.....

Projet 1: Les CSMs réduisent la pression intraoculaire et protègent les cellules ganglionnaires de la rétine dans un modèle de glaucome.....	62
---	----

Projet 2 : Caractérisation de la neuroinflammation de la rétine et des voies visuelles centrales dans un modèle de glaucome chez le rat.....	85
---	----

Projet 3 : Développement d'un modèle inflammatoire de sécheresse oculaire	
<i>in vitro</i>	94
DISCUSSION – CONCLUSION.....	101
REFERENCES.....	114

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ATMP	Advanced Therapy Medicinal Products
Ang-1	angiopoietin-1
AH	Aqueous Humor
AVC	Accident Vasculaire Cérébrale
BHE	Barrière Hémato-rétinienne
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BrDU	5-bromo-2'-deoxyuridine
CCL2	Monocyte Chemoattractant Protein 2
CDs	Cellules Dendritiques
NKs	cellules Natural Killer
CS	Cellules Suches
CGR	Cellules Ganglionnaires Rétiniennes
CSHs	Cellules Souches Hématopoïétiques
CSLs	Cellules Souches Limbiques
CSMs	Cellules Souches Mésoenchymateuses
CNTF	Ciliary Neurotrophic factor
CSP	Code de la Santé Publique
CFU-F	Colony-Forming Unit-Fibroblasts
CXCL12	Stromal cell-Derived Factor-1
CXCR4	Stromal cell-Derived Factor-1 Receptor
Cyr61	Cystein-rich, angiogenic inducer 61
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
EGF	Epithelial Growth Factor
EVC	Episcleral Vein Cauterization
FGF2 / 8 / 20	Fibroblast Growth Factor-2 / 8 /20
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GDNF	Glial cell-Derived Neurotrophic Factor
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GMP	Good Manufacturing Practices
HO-1	l'Hème Oxygénase-1
HGF	Hepatocyte Growth Factor

HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
IFN- γ	Interféron-gamma
IGF1	Insulin-Growth Factor
IL-1 / 6 / 10 / 11	Interleukin-1 / 6 / 10 / 11
IDO	<i>Immunosuppressive factors inducible NO synthase</i>
ISCT	International Society for Cellular Therapy
ICAM-1	<i>Intracellular Adhesion Molecule -1</i>
ECM	Matrice Extracellulaire
MMP-2	Metalloprotéinase-2
MC-CSM	milieu conditionné de CSMs
NGF	Neural-Growth Factor
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
Th1	Lymphocytes T helper 1
Th17	Lymphocytes T helper 1 7
Treg	Lymphocytes T régulateurs
PDGF	Platelet-Derived growth Factor
PLGF	Placenta Growth Factor
PIO	Pression Intra-Oculaire
GvHD	Réaction du greffon contre l'hôte
RP	Rétinite Pigmentaire
SO	Sécheresse Oculaire
SFB	Sérum foetal Bovin
SA	Sérums Humains Autologues
TGF- β 1	Transforming Growth Factor- β 1
TSP-1	Thrombospondine-1
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha
TSG-6	<i>TNF-α-stimulated gene/protein 6</i>
TLR	Toll-Like receptor
TRKC	Neurotrophic tyrosine kinase receptor
EUA	Uvéite Autoimmune
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les différents types de biothérapies

Figure 2 : le pape Innocent VIII

Figure 3: les différents types de cellules utilisées en thérapie cellulaire

Figure 4: Étapes de la chaîne de préparation des produits de santé soumis à la biovigilance

Figure 5: Thérapie cellulaire et médecine régénératrice

Figure 6: La multipotence des CSMs.

Figure 7: Mise en culture des CSMs après isolement

Figure 8: Les cellules périvasculaires pluripotentes expriment les marqueurs de CSMs

Figure 9: Représentation schématique d'une niche de cellules souches avec ses différents composants cellulaires.

Figure 10: Les CSMs périvasculaires de la moelle osseuse expriment une grande quantité de CCL2 et permettent le passage systémique des monocytes de la moelle.

Figure 11: Localisation périvasculaire et fonction des CSMs de la moelle osseuse.

Figure 12: Effets stimulants (+) ou inhibiteur (-) des CSMs sur les différentes cellules résidentes du cerveau

Figure 13: Astrocytes provenant de la différenciation de CSMs.

Figure 14 : Activation de la prolifération au niveau de l'angle irido-cornéen chez des souris glaucomateuses ayant reçu l'injection de CSMs ou de leur milieu conditionné.

Figure 15: Effet de l'environnement inflammatoire sur le phénotype des CSMs

Figure 16 : Tissu atteint au cours de dégénérescence rétinienne

Figure 17: Mécanismes d'action des CSMs dans la régénération neuronale

Figure 18 : Anatomie de l'angle irido-cornéen, du trabéculum et du canal de Schlemm

Figure 19 : Tissus atteints au cours de la pathologie glaucomateuse

Figure 20: Protection des cellules ganglionnaires d'explant rétinien en coculture avec les CSMs.

Figure 21 : Tissu atteint au cours des pathologies de la cornée

Figure 22: Effet des CSMs dans un modèle de brûlure chimique de la cornée chez le rat sur la cicatrisation (A), l'inflammation (B) et la néovascularisation (C).

Figure 23 : Tissu atteint au cours des uvéites

Figure 24: Maintien de l'intégrité tissulaire de la rétine induite par la greffe de CSMs dans un modèle expérimental d'uvéite autoimmune

Figure 25: Effet du préconditionnement des CSMs par des cytokines et du LPS sur leur production de facteurs trophiques et anti-inflammatoires⁵¹.

Figure 26: Représentation de tissu osseux artificiel et des pores formés sous 3 plans de vue différents

Figure 27: Image en microscopie confocale de microsphère et de microcapsule servant à l'encapsulation des CSMs

Figure 28 : Schéma anatomique de l'œil

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Liste des produits de santé relevant ou non de la biovigilance

Tableau II: Caractérisation des CSMs par immunomarquage en cytométrie de flux

Tableau III : Facteurs principaux sécrétés par les CSMs ayant un effet sur les cellules de l'immunité innée et adaptative

Tableau IV : Recensement des études cliniques utilisant les CSMs en ophtalmologie

INTRODUCTION

La pathologie glaucomateuse est une neuropathie optique, maladie oculaire insidieuse caractérisée par une dégénérescence progressive des cellules ganglionnaires de la rétine et du nerf optique aboutissant au rétrécissement du champ visuel puis à la cécité. Le facteur de risque majeur de cette dégénérescence est l'augmentation de la pression intraoculaire (PIO). La PIO est physiologiquement régulée par le trabéculum, filtre émonctoire de l'humeur aqueuse situé dans l'angle iridocornéen, angle formé par la rencontre de l'iris et de la cornée. Or, ce filtre dégénère progressivement au cours du glaucome provoquant une résistance à l'écoulement de l'humeur aqueuse et par conséquent une augmentation de la pression à l'intérieur de l'œil. Aujourd'hui, la prise en charge du glaucome repose sur des traitements qui visent à diminuer la pression intraoculaire. Cependant, de nombreux patients restent encore en échec thérapeutique et de nouvelles stratégies thérapeutiques sont toujours ardemment sollicitées que ce soit pour réduire la PIO, maîtriser la pathogénie au niveau trabéculaire ou protéger la fonction neuronale des cellules ganglionnaires de la rétine. Ainsi, cibler le trabéculum afin de ralentir sa dégénérescence ou restaurer sa fonction et/ou apporter des molécules neuroprotectrices constituent des pistes thérapeutiques intéressantes que la thérapie cellulaire à l'aide de cellules souches mésenchymateuses pourrait offrir.

Les cellules souches mésenchymateuses sont utilisées en clinique depuis une quinzaine d'année pour traiter différentes pathologies humaines. Elles sont décrites au niveau de la moelle osseuse comme assurant le maintien des niches de cellules souches hématopoïétiques en contrôlant notamment leur différenciation. Elles ont été identifiées et isolées à partir de nombreux tissus et organes de par leur présence dans le stroma et plus particulièrement autour des vaisseaux. Elles présentent des effets thérapeutiques majeurs par leurs propriétés de cellules souches, c'est-à-dire, pour remplacer des cellules spécialisées de certains tissus, mais plus particulièrement pour leur activité paracrine. Elles sécrètent une grande quantité de molécules et de facteurs de croissance leur conférant des propriétés intéressantes dans les processus de réparation et régénération de nombreux tissus.

Dans l'introduction de ce travail, nous allons tout d'abord présenter les cellules souches mésenchymateuses, leurs caractéristiques et leurs rôles faisant d'elles un outil thérapeutique exceptionnel. Nous aborderons ensuite les différentes pathologies oculaires pour lesquelles leur utilisation est d'ores-et-déjà envisagée ainsi que les outils développés pour optimiser leurs effets thérapeutiques. Puis, nous présenterons notre travail expérimental chez l'animal dans une première partie dédiée à l'approche thérapeutique de la trabéculopathie et de la

neuropathie glaucomateuse que nous avons développée par injection dans la chambre antérieure de l'œil de rat.

Dans une seconde partie nous nous attacherons à l'étude des lésions inflammatoires de la rétine et des centres supérieurs de la vision au cours de la pathologie glaucomateuse en utilisant le même modèle animal. Cette étude constitue un préalable indispensable à l'évaluation des effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires des CSMs qui est actuellement en cours.

Enfin, en dehors du glaucome, l'étude d'une autre pathologie inflammatoire chronique, la sécheresse oculaire, potentiellement candidate à ce type de thérapie, est également présentée dans ce manuscrit. Après une longue étape de développement et de validation d'un modèle *in vitro*, l'évaluation des capacités anti-inflammatoires du sécrétome des CSMs fait actuellement l'objet de travaux.

Enfin, nous discuterons de nos résultats en les confrontant à la littérature et nous conclurons en évoquant les perspectives sur lesquelles débouche ce premier travail, en termes d'application clinique.

GENERALITES

I. La Thérapie Cellulaire

I.1 Définition

Selon le Code de la Santé publique (CSP), « la thérapie cellulaire concerne les produits biologiques à effet thérapeutique issus de préparation de cellules vivantes humaines ou animales » (article L. 1243-1 du CSP). La thérapie cellulaire ou cytothérapie substitutive appartient à la famille des biothérapies, ensemble de thérapeutiques basées sur la manipulation *ex vivo* de cellules issues de leur organe d'origine (Figure 1). Elle consiste en la prévention ou au traitement de pathologies humaines par greffe de cellules souches ou différenciées visant à remplacer, réparer ou restaurer la fonction d'un tissu ou d'un organe lésé par un accident, une pathologie ou le vieillissement. Les cellules qui font l'objet de la thérapie ont été choisies afin de pouvoir être multipliées/traitées/modifiées *ex vivo*. La thérapie cellulaire est associée à trois grands types d'approche thérapeutique : la médecine régénératrice, l'immunothérapie ou la cancérologie notamment pour le traitement des leucémies.

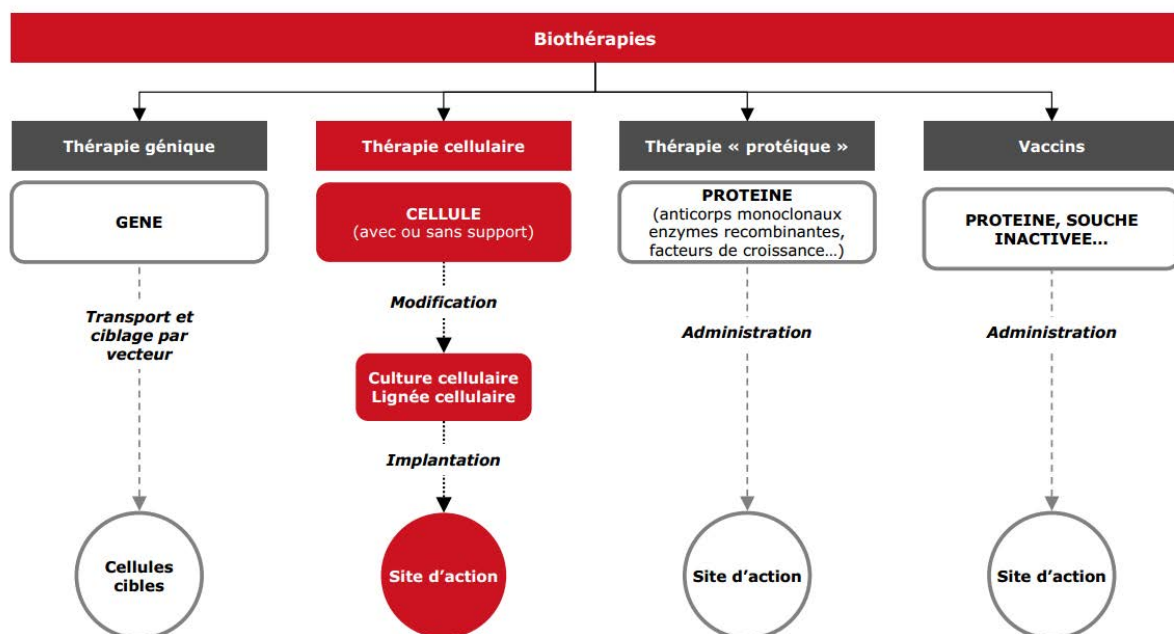


Figure 1 : Les différents types de biothérapies

I.2 Historique

La transfusion sanguine est considérée comme la première thérapie cellulaire. Elle remonte à l'année 1492 où le pape Innocent VIII aurait bu le sang de 3 jeunes gens d'une dizaine d'années pour se redonner vigueur. Les trois garçons moururent et le traitement apporta la mort également au pape (Figure 2). La notion de groupes sanguins A, B, O ne sera découverte que quatre siècles plus tard par Karl Landsteiner.



Figure 2 : le pape Innocent VIII

En 1958, cinq physiciens yougoslaves furent irradiés accidentellement par un réacteur nucléaire provoquant une diminution drastique de toutes leurs cellules sanguines mettant en jeu leur survie. Le concept des premières greffes de moelle osseuse fut mis en application à cette occasion en France. L'intervention sauvera quatre des patients irradiés, « des tentatives certes téméraires, mais pas infondées » conclurent les auteurs de l'intervention. Cette même année fut identifié les groupes HLA (*Human Leucocyte Antigen*) par Jean Dausset. Cette découverte ne résoudra pas tous les problèmes liés au risque de rejet mais permit le succès des premières véritables greffes au Fred Hutchison Cancer Center de Seattle dans les années 60 par Donnall Thomas¹. Afin de résoudre les problèmes liés aux rejets de greffes (GvHD : *graft versus host disease*), la solution la plus évidente fut la réalisation de greffes autologues qui apparurent en 1976 pour la première fois. La congélation des cellules de la moelle du patient avant l'aplasie induite par les traitements de chimio- et radiothérapie sera réalisée afin de pouvoir greffer l'échantillon cellulaire à son propre donneur. Cette alternative permettra, effectivement, de s'affranchir des rejets de greffe, cependant, l'échantillon cellulaire greffé peut contenir des cellules pathologiques ce qui favorisera le risque de rechute. Cependant, la greffe allogénique est indispensable pour le traitement de pathologies hématologiques au cours de laquelle l'effet GVL (*graft versus leukemia*) est recherché dans un but thérapeutique au prix d'un effet GvHD qu'il faudra maîtriser par des immunosuppresseurs.

En 1979, les premières greffes de peau sont réalisées grâce à des cultures de kératinocytes.

I.3 Principes généraux

Un protocole général de thérapie cellulaire se déroule en cinq étapes :

1. Le prélèvement des cellules soit chez le patient à traiter, soit chez un donneur.
2. Si nécessaire, purification des cellules prélevées pour ne garder qu'un seul type cellulaire
3. Si nécessaire, modification des cellules si elles proviennent d'un patient dont la maladie est d'origine génétique. Dans ce cas, les cellules prélevées devront être « corrigées » par transfert de gène. Cette opération combine thérapie génique et thérapie cellulaire (aussi appelée thérapie génique *ex vivo*)
4. Amplification des cellules
5. Réimplantation des cellules chez le malade au niveau du tissu ou groupe cellulaire qui dysfonctionne.

I.4 Différents types cellulaires utilisés

I.4.1 En fonction de leur origine

Il existe différents types de cellules pour l'utilisation en thérapie cellulaire. Les lignées cellulaires qui sont des cellules immortalisées, les cellules xénogéniques qui sont isolées à partir d'une espèce différente du receveur, les cellules allogéniques qui sont des cellules provenant d'un organisme différent mais de la même espèce et les cellules autologues qui viennent du même organisme (Figure 3). Les principales cellules utilisées en thérapie cellulaire sont les cellules autologues et allogéniques.

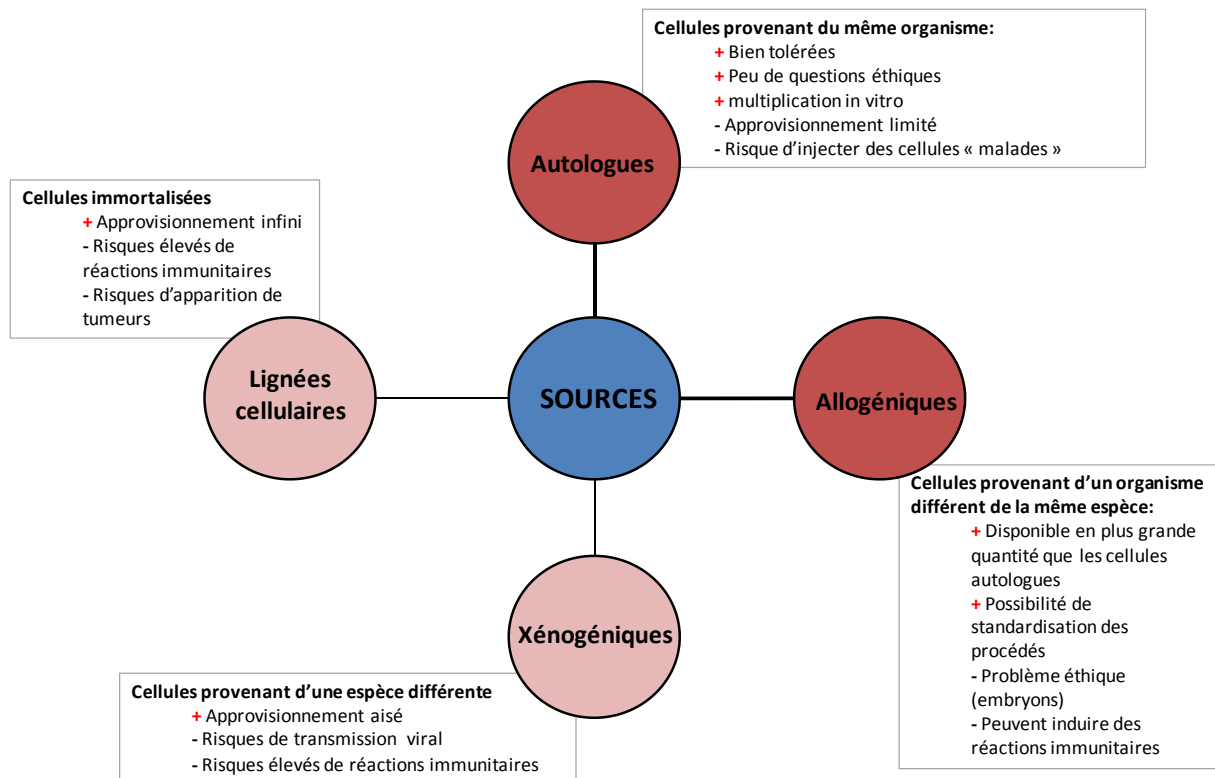


Figure 3: les différents types de cellules utilisées en thérapie cellulaire

I.4.2 En fonction de leur plasticité

Les cellules différenciées :

Une cellule différenciée possède des caractéristiques spécifiques, associées à une fonction précise. Par exemple, les globules rouges, qui transportent l'oxygène dans le sang, et les kératinocytes, qui produisent la kératine, n'ont pas les mêmes caractéristiques. Chaque tissu comporte un petit nombre de types de cellules différenciées, l'organisme humain en possède environ 200 types au total.

Les cellules « précurseurs » :

Les cellules « précurseurs » sont issues de cellules souches et ont déjà acquis un certain degré de spécialisation. Elles ne présentent plus de capacité d'autorenouvellement bien qu'elles conservent des propriétés de pluripotence qui varient en fonction des systèmes.

Les cellules souches :

Les cellules souches constituent une population hétérogène de cellules. Elles présentent deux propriétés communes qui sont leur capacité d'autorenouvellement, c'est-à-dire de se reproduire indéfiniment sans se différencier, et de différenciation en cellules spécialisées. On peut mettre en évidence quatre types de cellules souches selon qu'elles peuvent donner naissance à un type cellulaire (unipotent), à plusieurs types cellulaires différents mais originaire du même feuillet embryonnaire (multipotent), à plusieurs types cellulaires différents originaires de feuillets embryonnaires différents (pluripotent) ou encore à tous les types de cellules constituant l'ensemble de l'organisme (totipotent). Les cellules souches dites adultes sont aujourd'hui très utilisées dans les protocoles cliniques. En effet, au regard des cellules souches embryonnaires ou fœtales, les cellules souches adultes ne posent pas de problème éthique, permettent des greffes autologues, et ont déjà témoigné d'une grande efficacité thérapeutique.

I.5 Les commissions de vigilance

Les établissements de santé sont tenus de mettre en œuvre des systèmes de gestion des risques. Ils doivent donc mettre en place des commissions de vigilance sanitaires. La coordination de la vigilance sanitaire est spécifique à chaque établissement de santé.

L'hémovigilance est l'ensemble de procédures de surveillance organisée depuis la collecte du sang et de ses composants jusqu'au suivi des receveurs, tout cela afin de recueillir et évaluer les informations sur les effets inattendus ou indésirables résultant de l'utilisation des poches de sang et pour en prévenir l'apparition (Loi 93-5 du 4 janvier 1993)

La matériovigilance consiste en la surveillance des incidents pouvant survenir lors de l'utilisation du matériel médical. Elle vise à garantir la sécurité des dispositifs médicaux (Article L5211-1 du CSP).

La pharmacovigilance est relative aux médicaments et à leurs effets indésirables. Elle s'exerce sur les médicaments à AMM (autorisations de mise sur le marché), et à ATU (autorisation temporaire d'utilisation) pour les maladies rares, graves ou développées à l'étranger.

La réactovigilance concerne les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* utilisés en laboratoire pour réaliser des examens biologiques.

La biovigilance veille à la sécurité de l'utilisation à but thérapeutique de produits issus du corps humain (cellules, tissus, organes et même lait maternel) comme lors de greffes ou de thérapie cellulaire (décret n°2003-1206 du 12 décembre 2003) et des produits thérapeutiques annexes (PTA) entrant en contact avec les produits issus du corps humain (le lait maternel entre également dans son champ d'application).

Dans cette étude nous avons voulu évaluer l'intérêt d'une approche de thérapie cellulaire dans la prise en charge du glaucome. La thérapie cellulaire est soumise aux recommandations à la commission de biovigilance dont les fonctions vont être abordées ci-dessous.

I.6 La biovigilance

L'utilisation à des fins thérapeutiques d'éléments du corps humain peut être à l'origine de la transmission d'agents infectieux. Bien que de bonnes pratiques de fabrication et de collecte ainsi que des mesures de contrôle et d'assurance qualité soient mises en place, le risque zéro n'existe pas. Ainsi, la nécessité d'une vigilance des organes, des tissus, des cellules, ainsi que des thérapies innovantes telles la thérapie cellulaire, s'est peu à peu imposée. Une commission spécifique de vigilance a été créée le 12 décembre 2003 (Décret n° 2003-1206) sous le nom de biovigilance.

Produits de santé relevant de la biovigilance	Produits ne relevant pas de la biovigilance
<ul style="list-style-type: none"> - Les organes et tissus issus du corps humain et utilisés à des fins thérapeutiques chez l'homme, ainsi que leurs dérivés que ceux-ci soient utilisés en routine ou dans le cadre d'un essai clinique - Les préparations de thérapie cellulaire utilisées dans des activités de routine - Les tissus et cellules utilisés en tant que matière première pour incorporation dans un dispositif médical ou un médicament (MTI) - Le lait maternel à usage thérapeutique - Les dispositifs médicaux implantables incorporant des éléments et produits issus du corps humain - Les produits thérapeutiques annexes* (PTA) y compris ceux utilisés en assistance médicale à la procréation (AMP) 	<ul style="list-style-type: none"> - Gamètes, embryons, tissus germinaux (AMP vigilance) - Médicaments de thérapies cellulaire ou tissulaire entrant dans le cadre des MTI, d'origine humaine ou xénogénique, soumis à une autorisation de mise sur le marché (AMM) ou utilisés dans le cadre d'un essai clinique (pharmacovigilance) - Médicaments de thérapie génique (pharmacovigilance) - Produits ou éléments du corps humain utilisés dans un cadre autologue et dans un même temps opératoire (actes de soin) - Tout autre dispositif médical (matériorvigilance) - Produits sanguins labiles (hémo-vigilance) - Médicaments biologiques : médicaments dérivés du sang, protéines d'extraction (pharmacovigilance) - Dispositifs médicaux de diagnostics in vitro (réactovigilance) - Produits cosmétiques et produits de tatouages à visée esthétique (cosmétovigilance)

Tableau I: Liste des produits de santé relevant ou non de la biovigilance

Plus précisément, la biovigilance est définie dans le code de la santé publique (CSP) en ces termes: "La biovigilance a pour objet la surveillance des incidents et des risques d'incidents relatifs aux éléments et produits du corps humain utilisés à des fins thérapeutiques, et aux produits, autres que les médicaments, qui en dérivent, aux dispositifs médicaux les incorporant et aux produits thérapeutiques annexes, ainsi que des effets indésirables résultant de leur utilisation. Sont exclus les gamètes et les produits sanguins labiles" (Art. R.1211-29 du CSP). Elle implique une veille sur l'ensemble des étapes de la chaîne allant des sélections clinique et biologique du donneur au suivi médical des patients, donneurs vivants ou receveurs (Figure 4).

Figure 4: Etapes de la chaîne de préparation des produits de santé soumis à la biovigilance

La médecine régénératrice a pour but de remplacer les cellules déficientes ou de reconstituer des organes endommagés. Elle peut être appliquée aux maladies dégénératives (maladie de Parkinson) et aux pathologies impliquant une destruction des cellules, tissu ou organe (ex: greffes d'îlots de Langerhans, reconstruction épidermique). La médecine régénératrice concerne l'ingénierie tissulaire, la thérapie cellulaire et la combinaison des deux (Figure 5).

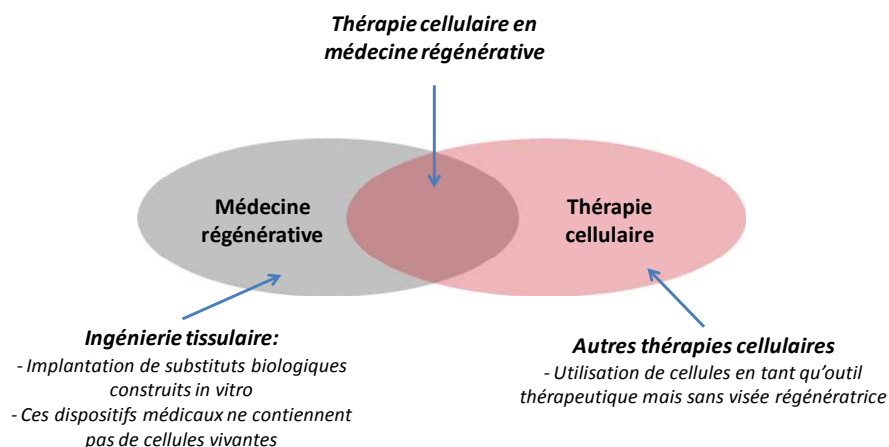


Figure 5: Thérapie cellulaire et médecine régénératrice

L'association de l'ingénierie tissulaire à la thérapie cellulaire a montré son efficacité pour optimiser les effets de la thérapie cellulaire et contourner certaines limites de cette dernière.

Les thérapies cellulaires peuvent utiliser des cellules autologues (donneur et receveur identiques) ou allogéniques, (donneur et receveur différents). Lorsqu'elles sont considérées comme des spécialités pharmaceutiques ou autres médicaments fabriqués industriellement, elles répondent aux règles applicables au médicament et entrent dans le champ de la pharmacovigilance. En revanche, quand elles ne sont pas fabriquées de manière industrielle, elles sont qualifiées de préparations de thérapie cellulaire, y compris lorsque les cellules humaines servent à transférer du matériel génétique et sont alors soumises à la biovigilance.

En France, la thérapie cellulaire dépend à l'ANSM de la Direction des thérapies innovantes, des produits issus du corps humain et des vaccins, dont font partie les cellules souches mésenchymateuses, considérées comme des médicaments de thérapie innovante (MTI ou *Advanced Therapy Medicinal Product, ATMP*) tel que le définit le règlement européen CE 1394/2007 qui complète la directive 2001/83/CE du parlement européen et du conseil. Plus récemment, les médicaments de thérapie innovante préparés ponctuellement (MTI-PP) sont définis par la loi n° 2011-302 du 22 mars 2011. Ces médicaments à préparation ponctuelle sont soumis au même niveau de sécurité que les MTI. Ce statut a été prévu pour permettre aux petites structures et notamment aux hôpitaux d'accéder à l'innovation. Le statut de MTI-PP ne peut être utilisé que dans les phases précoces des essais cliniques, il devra être reconnu comme MTI pour son développement futur ce qui implique la reconnaissance des essais cliniques menés avec application des bonnes pratiques de fabrication notamment.

II. Les cellules souches

II.1. Généralités sur les cellules souches

Les cellules souches (CS) sont des cellules indifférenciées qui possèdent des propriétés d'autorenouvellement et de plasticité. L'autorenouvellement est la capacité à se diviser pendant de longues périodes en donnant naissance à des cellules filles identiques à la cellule mère. Cette propriété n'est pas spécifique des cellules souches, elle est retrouvée chez des cellules déjà engagées dans une lignée comme les progéniteurs érythroblastiques le font à l'état normal sous l'effet d'un facteur de transcription PU.1². L'état « souche » d'une cellule (*stemness*) pourrait être un état de tous les possibles à l'opposé de la différenciation, état dans lequel les options seraient réduites. Deux hypothèses peuvent être proposées : soit la cellule souche est dans un état « vierge » n'exprimant aucun marqueur de différenciation, ceux-ci seraient acquis progressivement durant les étapes de différenciation, soit la cellule souche exprimerait la plupart, voire tous les marqueurs, à un faible niveau et réduirait l'expression de certains gènes au profit d'autres pendant la différenciation. Cette seconde hypothèse semble être privilégiée.

Concernant la division cellulaire, on distingue les divisions symétrique et asymétrique. La première génère deux cellules filles identiques, soit semblables à la cellule mère (division homoplastique), soit à un stade plus différenciées que la cellule mère (division hétéroplastique). Ces mécanismes sont principalement trouvés au stade embryonnaire mais également chez l'adulte pour assurer un stock stable et permanent de cellules souches lesquelles sont alors rapidement mobilisables en cas d'atteinte tissulaire.

La division cellulaire asymétrique donne naissance à deux cellules filles différentes, l'une identique à la cellule mère et l'autre engagée dans une voie de différenciation spécifique. Ces mécanismes sont souvent observés dans les tissus à fort renouvellement tels que les cellules souches hématopoïétiques de la moelle, les épithéliums cutanés et digestifs. Au niveau des niches tissulaires, les cellules souches peuvent sortir de leur état de quiescence afin de remplacer les cellules spécialisées sénescents d'un tissu et également conserver un stock de cellules souches mobilisables. La plasticité cellulaire est une autre caractéristique spécifique des CS et constitue leur pouvoir de différenciation en cellules matures, spécialisées et fonctionnelles.

Le plus souvent, les CS sont classées en fonction de leur pouvoir de différenciation, c'est-à-dire selon les options d'engagement dans des voies de différenciation possibles. C'est ainsi qu'on distingue :

- les cellules souches totipotentes théoriquement capables de donner naissance à toutes les cellules qui constituent l'organisme. Ces cellules sont issues du zygote et correspondent à la fois aux cellules embryonnaires et extra embryonnaires
- Les cellules souches pluripotentes qui forment la masse interne cellulaire du blastocyste à partir duquel l'embryon se développe et qui proviennent de différents feuillets. Ce sont les cellules souches embryonnaires qui peuvent donner naissance aux cellules des trois feuillets embryonnaires.
- Les cellules souches multipotentes qui constituent les cellules souches dites fœtales ou adultes, pouvant se différencier en un nombre limité de cellules spécialisées et originaires du même feuillet embryonnaire. Ce sont par exemple les cellules souches hématopoïétiques.
- Les cellules souches unipotentes sont des cellules capables de ne se différencier qu'en un seul type cellulaire mais qui gardent leur pouvoir d'autorenouvellement.

Cependant, les CS peuvent également être classées en fonction de leur origine permettant de distinguer les cellules souches embryonnaires, celles issues du fœtus sont les cellules souches fœtales et celles issues de l'organisme adulte, les cellules souches adultes.

Depuis 2006, une nouvelle catégorie de CS a été identifiée, ce sont les *induced Pluripotent Stem Cells* (iPS). Les iPS sont des cellules souches issues de la reprogrammation par manipulation génétique de cellules différenciées. L'introduction de facteurs de transcription identifiés chez les CS embryonnaires, Oct3/4, Sox2, KLF4, et c-Myc, dans des cellules différenciées induit une dédifférenciation de celles-ci leur conférant ainsi des propriétés de pluripotence. Cette découverte par Yamanaka et son équipe en 2006 permet de contourner les limites inhérentes à l'utilisation des CS embryonnaires en clinique (éthique, risque de rejet)³ et a valu à leurs auteurs le prix Nobel de médecine en 2012.

Les CS adultes sont présentes dans tout l'organisme et permettent d'assurer l'homéostasie tissulaire grâce au remplacement des cellules mortes par apoptose ou par nécrose suite à une lésion. Les CS adultes présentent également la capacité de maintenir un état de dormance les

rendant plus résistantes aux agressions et pendant lequel elles ont une activité métabolique faible. Ces mécanismes d'autorenouvellement, de quiescence et de plasticité permettent aux organes de préserver leur fonction pendant toute la vie de l'organisme. Le processus de vieillissement implique un ralentissement du renouvellement cellulaire permettant le maintien de la fonction des tissus. Ce ralentissement est à l'origine des dégénérescences d'organes et sont lié à une sénescence des CS adultes tissulaires comme les cellules souches mésenchymateuses⁴.

II.2. Les cellules souches mésenchymateuses

Les CSMs ont été identifiées et isolées pour la première fois à partir de la moelle osseuse par Alexander Friedenstein qui remarqua la présence d'une colonie cellulaire de morphologie fibroblastique adhérente au plastique à partir de cellules stromales de la moelle osseuse de rongeurs. Il a pu mettre en évidence que ce type cellulaire est capable de former une colonie *in vitro*, qu'il a nommée *Colony-Forming Unit-Fibroblasts* (CFU-F) et qui pouvait développer, après injection sous la capsule rénale, du tissu fibreux, de l'os et de la moelle osseuse⁵. En 1988, Owen a montré que ces cellules ont des capacités d'autorenouvellement et de différenciation caractéristiques des cellules souches⁶. Enfin, en 1991, Caplan a introduit le nom de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) pour caractériser cette population de cellules à l'origine notamment du stroma médullaire, de l'os, du cartilage et des fibroblastes⁷. Comme toutes les CS, les CSMs sont des cellules immatures capables de s'autorenouveler et de générer plusieurs types de cellules différenciées matures et fonctionnelles. Elles sont capables de se diviser pendant plusieurs générations *in vitro* tout en gardant leur pouvoir de différenciation.

Concernant la capacité d'autorenouvellement des CSMs, les études *in vitro* montrent que celles-ci sont capables de se diviser pendant plusieurs générations sans changement de morphologie ni perte de leur pouvoir de différenciation⁸. La démonstration *in vivo* de leur capacité d'autorenouvellement arrivera beaucoup plus tard en 2007 avec le travail de l'équipe de P.Bianco⁹. D'autre part, les études de cycle cellulaire révèlent que seule une petite proportion des CSMs est engagée activement dans la prolifération. En effet, la majorité des cellules est regroupée dans la phase G0. Cet état de quiescence des CSMs est aussi une caractéristique connue des CS qui ne s'activent, c'est-à-dire prolifèrent et se différencient, qu'en cas d'atteinte tissulaire.

Les CSMs se différencient classiquement en cellules mésodermiques, plus précisément en ostéoblastes, chondroblastes, adipocytes ou fibroblastes ; toutes les cellules de la voie mésodermique¹⁰. En outre, elles peuvent également donner naissance à des cellules matures provenant des trois feuillets embryonnaires avec l'ajout de facteurs spécifiques in vitro (agents déméthylants de l'ADN). Des cellules spécialisées du feuillet ectodermique¹¹, neuroectodermique¹², et endodermique¹³ peuvent ainsi être obtenues (Figure 6). L'origine des CSMs a longtemps été considérée comme mésodermique, cependant il a été montré qu'au niveau embryonnaire, elles dérivait de différentes sources embryonnaires et notamment du neuroépithélium de la crête neurale¹⁴. Ces CSMs seraient particulièrement impliquées dans l'établissement des niches médullaires de cellules souches hématopoïétiques (CSHs)¹⁵.

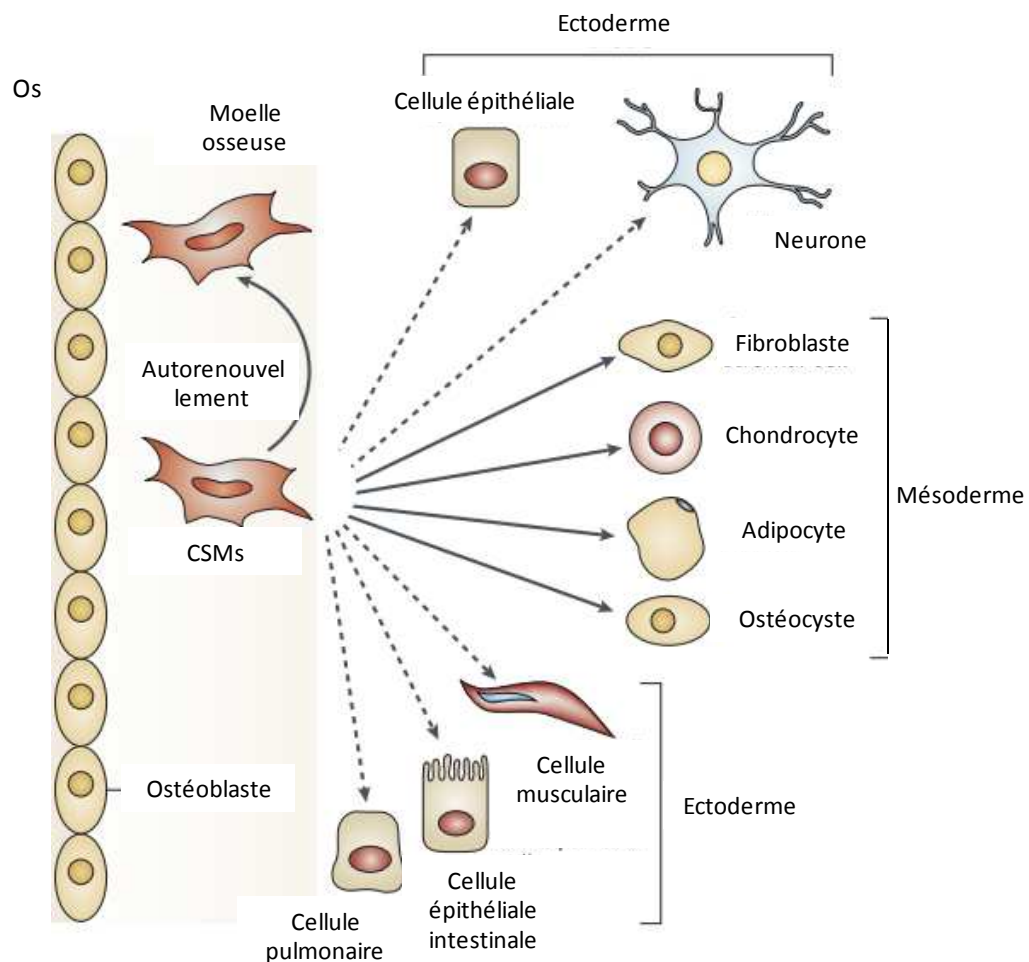


Figure 6: La multipotence des CSMs.

Les flèches pleines correspondent aux différenciations classiques des CSMs en cellules mésodermiques. Les flèches en pointillé montrent les différenciations non classiques des CSMs¹⁶.

II.2.1 Identification des CSMs

Les CSMs sont des cellules d'apparence fibroblastique qui présentent de nombreux antigènes de surface. La caractérisation précise des CSMs n'est pourtant pas évidente puisque, à l'heure actuelle, aucun marqueur spécifique n'a pu être identifié. De plus, il existe une variabilité d'expression de certains marqueurs en fonction de l'origine tissulaire des CSMs¹⁷.

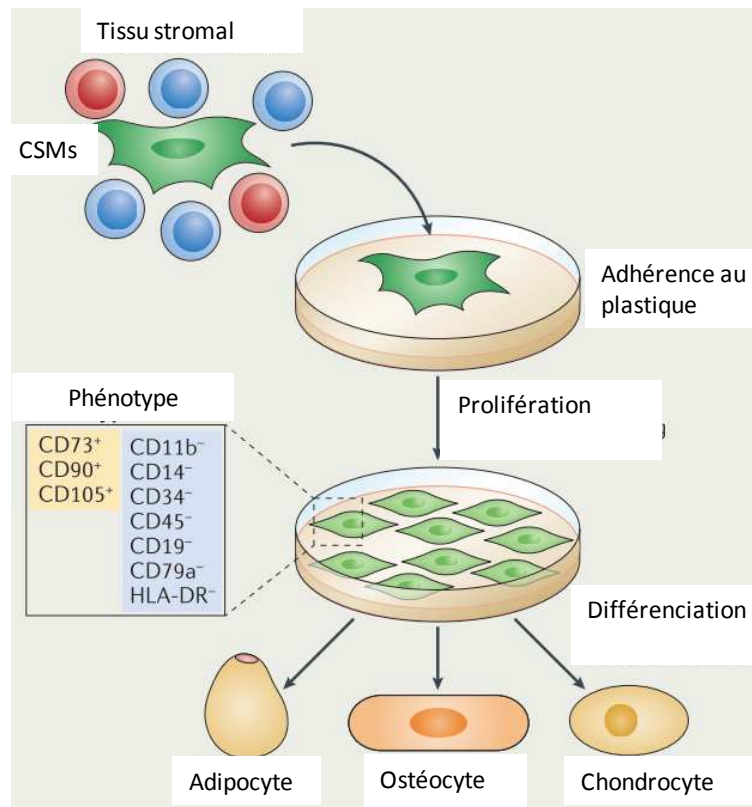


Figure 7: mise en culture des CSMs après isolement¹⁸

En 2006, l'International Society for Cellular Therapy (ISCT) a proposé des standards de caractérisation des CSMs¹⁹ (Figure 6) qui comprennent:

- l'adhérence cellulaire au plastique dans des conditions de culture standards,
- un phénotype cellulaire défini par cytométrie en flux en utilisant un panel d'antigènes de surface dont l'expression est positive et un panel d'antigènes dont l'expression est négative (Tableau II)
- un potentiel de différenciation multipotent *in vitro* dans des conditions standards vers les trois voies mésenchymateuses : ostéoblastes, chondroblastes et adipocytes.

Antigènes présents à la surface des CSMs ($\geq 95\%$)	Antigènes absents de la surface des CSMs ($\leq 2\%$)
CD105 (SH2, endogline) CD73 (SH3, SH4, ecto5'nucléotidase) CD90 (Thy-1) CD271 (récepteur de faible affinité au NGF) CD106 (VCAM-1) CD54 (ICAM-1) CD29 (ITGB1) CD44 (Récepteur à l'acide hyaluronique)	CD45 (marqueur leucocytaire) CD34 (progéniteurs hématopoïétiques/cellules endothéliales) CD14 ou CD11b (monocytes et macrophages) CD79 α ou CD19 (lymphocytes B) HLA-DR (en l'absence de stimulation par l'interféron γ)

Tableau II: Caractérisation des CSMs par immunomarquage en cytométrie de flux

Depuis 2008, les CSMs ont été décrites comme étant périvasculaires et, par conséquent, présentes dans de nombreux tissus de l'organisme²⁰. Selon leur origine, les CSMs présentent des différences en fonction de leur potentiel de différenciation²¹ et de leur profil d'expression génique²². Par exemple, les CSMs périvasculaires partagent beaucoup de similitudes morphologiques et phénotypiques avec les péricytes. Cette ressemblance interroge sur la vraie nature des CSMs²³. Aujourd'hui encore beaucoup de questions restent en suspens quant à la définition d'une unité cellulaire regroupant les CSMs issus de l'ensemble de l'organisme. Il est aujourd'hui nécessaire que la communauté scientifique trouve un consensus. En attendant, un complément est apporté par des études fonctionnelles en sus de la caractérisation phénotypique, afin d'homogénéiser les protocoles de préparation des CSMs pour une application donnée. L'ISCT nous donne, par exemple, des critères immunologiques auxquels devraient répondre les CSMs dans la perspective d'une application clinique²⁴.

II.2.2 Localisation

Les CSMs ont tout d'abord été isolées à partir des différents tissus squelettiques vascularisés tels que le tissu osseux et la moelle osseuse, où elles ne représentent qu'une faible fraction des cellules mononucléées¹⁰. Puis, à partir du tissu adipeux, où elles sont 100 à 1000 fois plus abondantes que dans la moelle. Et également à partir du cartilage qui est non vascularisé. Elles ont ensuite été isolées à partir d'autres tissus tels que le sang du cordon ombilical¹⁷ ou menstruel²⁵, la pulpe dentaire²⁶ ou encore au niveau de tissus ophtalmologiques comme le trabéculum²⁷ et le limbe²⁸. Silva Meirelles et al. sont parvenus à isoler des CSMs répondant aux critères établis par l'ISCT en 2006 à partir de nombreux tissus de l'organisme^{19,21}. Ces résultats posent des questions sur le rôle, l'identité et la réelle localisation des CSMs. Les

CSMs, semblant absentes du sang circulant, sont cependant présentes et facilement isolables à partir des vaisseaux sanguins ce qui expliquerait leur présence dans tous les tissus vascularisés de l'organisme²⁰. Plus précisément, les CSMs seraient présentes dans des niches périvasculaires qui constitueraient leur environnement normal.

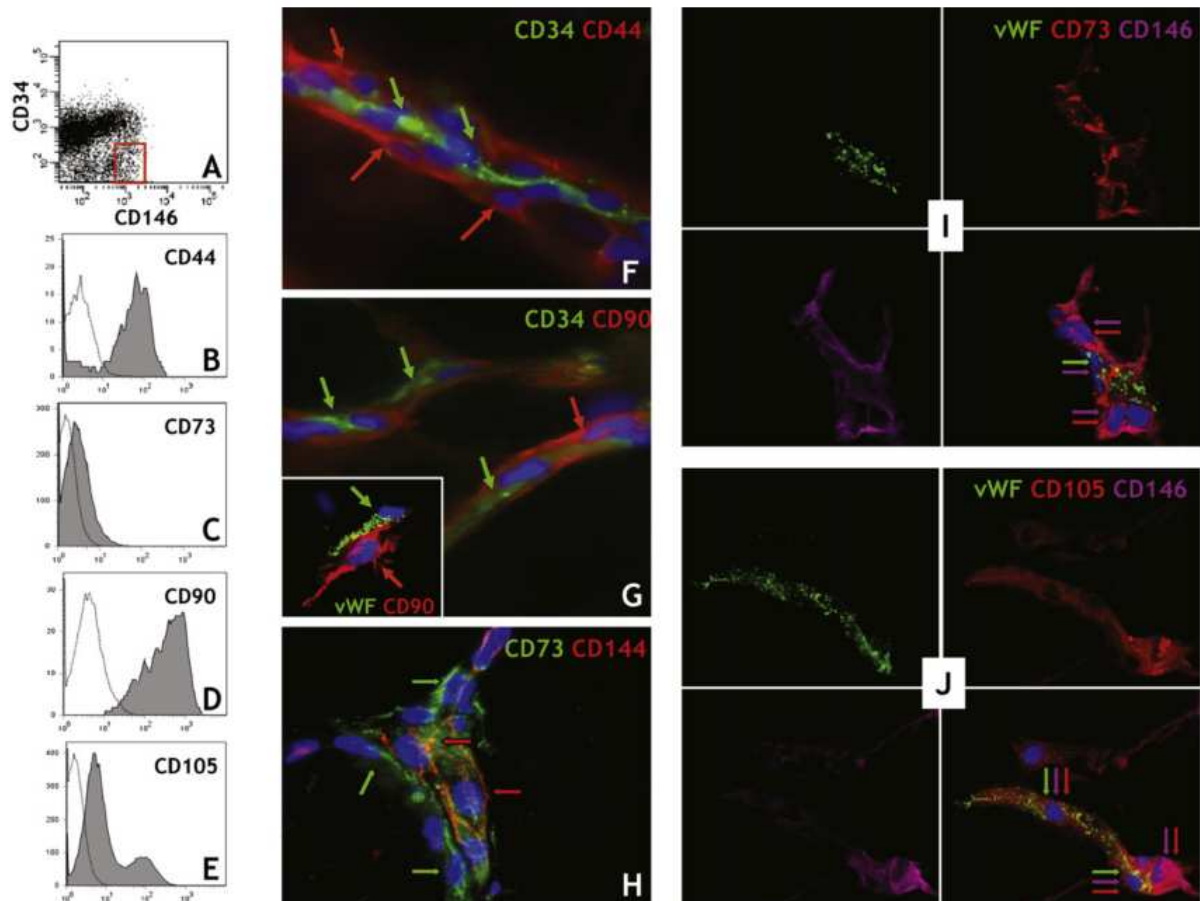


Figure 8: Les cellules périvasculaires pluripotentes expriment les marqueurs de CSMs²⁰

Cette localisation périvasculaire a été mise en évidence dans une étude visant à caractériser les cellules qui constituent la paroi des vaisseaux sanguins. Il a alors été retrouvé des cellules musculaires lisses, des péricytes, des cellules endothéliales ainsi que des cellules ayant la capacité de se différencier en cellules mésodermiques (ostéocytes, chondrocytes et adipocytes) et exprimant des marqueurs de CSMs. Finalement, au regard des critères d'identification de l'ISCT¹⁹, ces cellules sont bien des CSMs²⁰.

II.2.3 Rôle physiologique

Bien que de nombreuses études aient caractérisé les propriétés des CSMs *in vitro*, leur véritable fonction *in vivo* reste mal définie. Les CSMs exercent des fonctions spécifiques dépendant du tissu d'origine et du contexte physiologique dans lequel elles se trouvent.

Un rôle de cellules souches pour les tissus squelettiques, un rôle de cellules de niches servant de support à l'homéostasie et aux fonctions de réparation tissulaire et un rôle d'immunomodulation.

II.2.3.1 Rôle de cellules souches

Le premier rôle des CSMs est d'assurer le renouvellement physiologique des cellules spécialisées des tissus squelettiques et également en cas d'atteinte tissulaire. Aujourd'hui, les CSMs sont utilisées en clinique dans des protocoles de réparation osseuse ou articulaire pour recoloniser la zone atteinte (cf. partie B.1)⁷.

II .2.3.2 Rôle dans les niches de la moelle osseuse

Une niche est définie par le microenvironnement qui protège les cellules souches des stimuli. Ces niches contrôlraient la différenciation, l'apoptose ou encore l'expansion des cellules souches tissulaires. C'est une structure anatomique qui intègre les facteurs locaux et systémiques contrôlant le comportement et notamment la balance entre quiescence, auto-renouvellement, différenciation et mobilisation des cellules souches²⁹. Elles sont composées d'une partie cellulaire : cellules souches elles-mêmes et cellules stromales qui communiquent entre elles par interactions directes ou par l'intermédiaire de facteurs solubles et d'une partie non cellulaire, la matrice extracellulaire. Ces niches sont également vascularisées afin d'apporter les facteurs systémiques et de permettre le nichage (entrée) ou la mobilisation (sortie) des cellules souches. Enfin, des neurones ont été identifiés au sein des niches de cellules souches participant à la régulation de leur mobilisation^{29,30}.

Les CSMs ont d'abord été décrites à partir de la moelle osseuse comme une population cellulaire de forme fibroblastique. La différenciation des CSMs en ostéoblastes dans une fonction de maintien de l'homéostasie osseuse a été rapidement décrite. Leur pouvoir de différenciation en adipocytes et en chondrocytes a d'abord été expliqué comme une marque

de sénescence à l'origine de l'ostéoporose ou alors comme un mécanisme de réparation lors de fracture osseuse³¹. Progressivement, la compréhension de la physiologie de la moelle osseuse et de la nature des cellules qui la composent a permis de faire progresser notre connaissance sur les fonctions des CSMs médullaires et notamment sur les niches des cellules souches hématopoïétiques (CSHs).

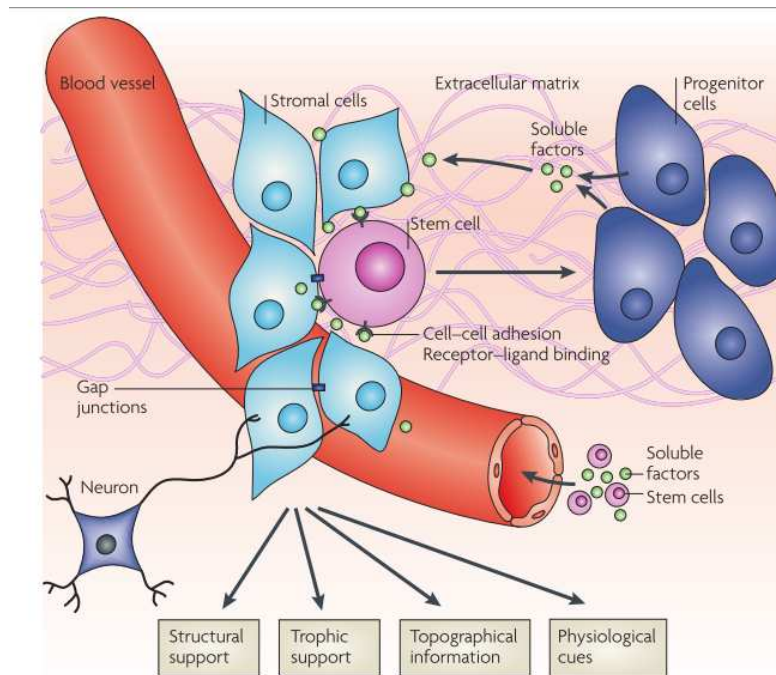


Figure 9 : Représentation schématique d'une niche de cellules souches avec ses différents composants cellulaires²⁹.

Les CSHs sont présentes dans la moelle osseuse dans des niches. Comme décrit précédemment, ces niches régulent l'activité des CS en fonction de facteurs systémiques, en réponse notamment à des lésions ou infections^{32,33}, mais également en fonction de facteurs locaux provenant de leur microenvironnement. De nombreuses équipes ont focalisé leurs travaux sur la compréhension et la structuration des niches de CSHs médullaires. En effet, les différents types cellulaires abrités dans la moelle osseuse, ostéoblastes, cellules endothéliales, cellules stromales, CSMs, ne constituent pas de simples soutiens à l'hématopoïèse mais y participent activement au travers des facteurs solubles qu'ils sécrètent^{33,34}.

Dans la moelle, les CSMs semblent présenter un rôle prédominant. En effet, elles ont été identifiées comme une composante majoritaire des niches de CSHs de médullaires recevant les afférences des nerfs adrénergiques^{30,35} et participant à la fois au contrôle de la différenciation des CSHs³⁶ et au recrutement des cellules hématopoïétiques matures³⁷.

De la même manière, il a été montré récemment qu'elles sont des intermédiaires indispensables au recrutement et à la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques et cela passerait par les lymphocytes CD8+, l'IFN- γ et l'IL-6. En effet, l'IFN- γ sécrété par les CD8+ à la suite d'une infection virale stimule la synthèse et la libération d'IL-6 par les CSMs médullaires entraînant une accumulation de progéniteurs hématopoïétiques dans la moelle et une augmentation du nombre de cellules myéloïdes en périphérie³⁶. Ainsi, les CD8+ induisent la mobilisation des cellules souches/progénitrices hématopoïétiques indirectement via l'interaction avec les CSMs. En outre, les CSMs semblent impliquées, via la sécrétion de CCL2, dans le recrutement de monocytes CCR2+ de la moelle vers la circulation systémique. En effet, dans un modèle murin d'infection à *Listeria monocytogenes*, Chao Shi et al. ont montré que les CSMs médullaires expriment des Toll-Like receptor (TLR) leur permettant de répondre à l'infection par la libération de CCL2 et ainsi contribuer au recrutement de monocytes³⁸.

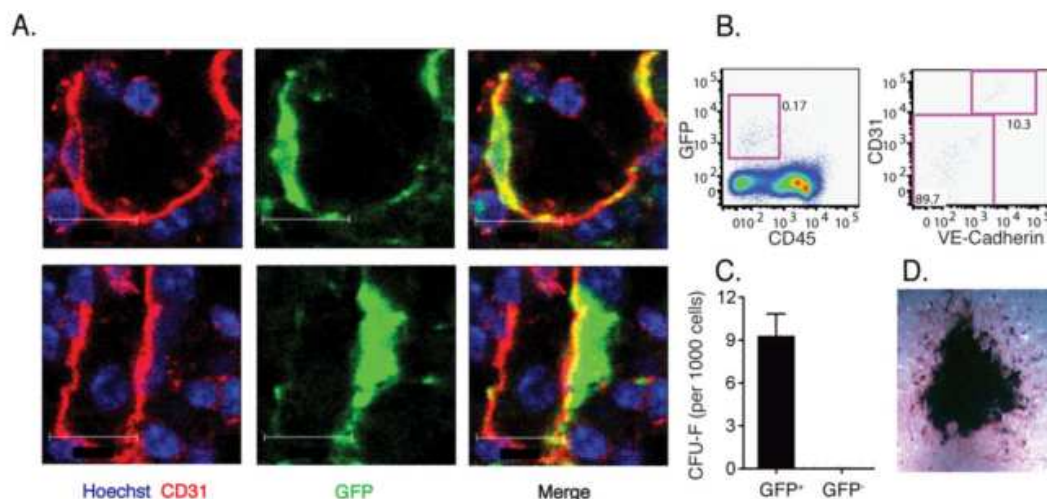


Figure 10: Les CSMs périvasculaires de la moelle osseuse expriment une grande quantité de CCL2 et permettent le passage systémique des monocytes de la moelle. Sont marqués, en bleu, les noyaux des cellules (Hoechst), en rouge, les cellules endothéliales et en vert, les cellules productrices de CCL2 (MSCs périvasculaires)³⁸.

A côté de l'axe CCL2-CCR2, l'axe CXCL12-CXCR4 a été identifié comme primordial dans le développement des lymphocytes T³⁹ et B⁴⁰ mais également dans le maintien de la localisation des CSHs dans la moelle osseuse⁴¹. Greenbaum et al. ont confirmé l'importance de CXCL12 pour le maintien des CSHs dans les niches de la moelle osseuse, et pour la maturation des lymphocytes B. Ils montrent que c'est principalement le CXCL12 produit par les CSMs périvasculaires qui contrôle ces fonctions. En effet, la délétion en CXCL12 spécifiquement chez les CSMs de la moelle induit une perturbation importante du maintien des CSH, sans pour autant altérer la fonction et le développement des lymphocytes B⁴².

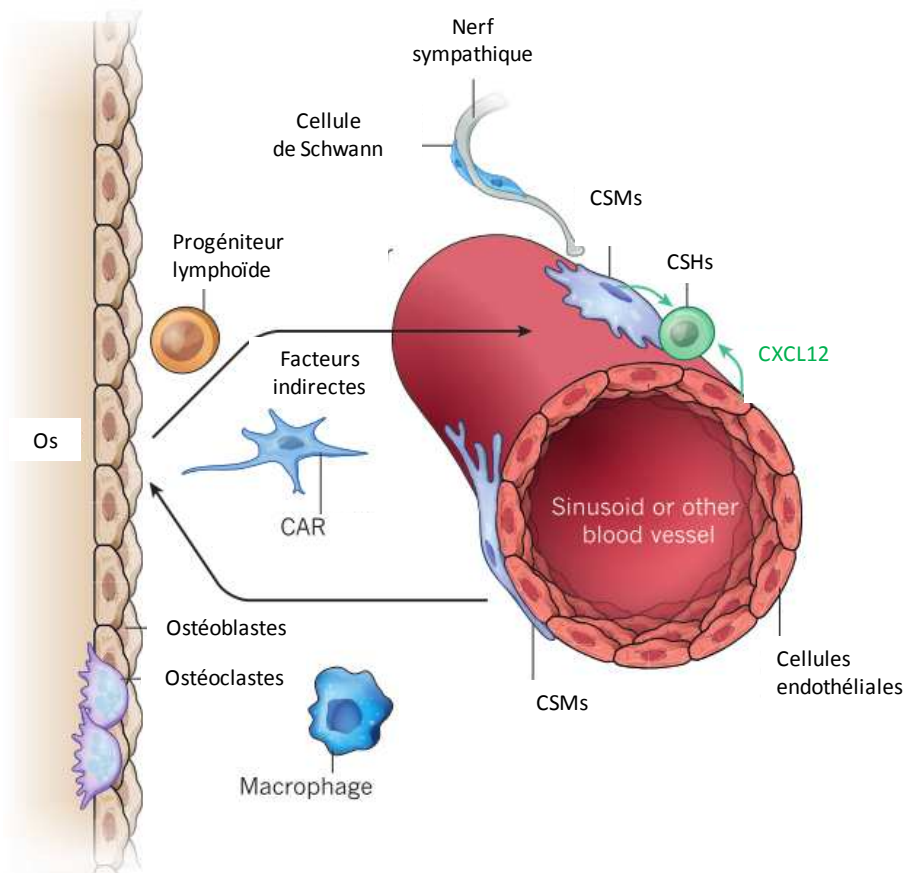


Figure 11: Localisation périvasculaire et fonction des CSMs de la moelle osseuse⁴³.
CAR: cellules réticulaires qui expriment du CXCL12

Les rôles différents des CSMs au sein de la moelle osseuse en tant que cellule souche dans la formation/réparation/renouvellement des tissus osseux et dans la régulation des niches des CSHs posent la question d'une origine commune de ces cellules (Figure 10). Récemment, Isern et al. ont montré que les CSMs médullaires impliquées dans le renouvellement tissulaire et les CSMs jouant un rôle dans la régulation des niches des CSHs n'avaient pas la même

origine embryonnaire. En effet, les CSMs originaires du neuroépithélium de la crête neurale (nestin+), à partir du moment de la naissance et au travers de la synthèse de CXCL12, étaient indispensables pour assurer la migration des CSHs du foie vers la moelle osseuse et ainsi constituer les niches médullaires de CSHs, tandis que les CSMs issus du feuillet mesodermique (nestin-) semblent avoir un rôle de progéniteurs des tissus osseux et articulaires¹⁵.

Encore aujourd'hui de nombreuses équipes travaillent sur la compréhension des systèmes de régulation de l'ensemble des mécanismes complexes qui constituent l'hématopoïèse. Cette régulation fait appel à de nombreux acteurs cellulaires et il semble de plus en plus qu'une sous-population de CSMs (nestin+) de la moelle osseuse y joue un rôle fondamental. L'identification des facteurs sécrétés par les CSMs participant au contrôle de certains mécanismes de l'hématopoïèse et au recrutement des cellules hématopoïétiques matures constitue un enjeu majeur dans des perspectives de développement clinique. L'important travail de criblage réalisé par Charbord et al. suite à la coculture des CSHs avec différents types cellulaires interagissant avec les niches de CSHs à différents stade du développement, a permis d'identifier certains facteurs essentiels au support des CSHs⁴⁴.

II.2.3.3 Rôle sur l'immunité

Les CSMs interagissent de manière étroite avec les cellules de l'immunité innée au travers d'interactions directes et indirectes et sont décrites comme ayant un rôle de médiateurs de plusieurs de leurs fonctions. L'interaction des CSMs avec les cellules immunitaires sera abordée dans la partie B.3 de ce manuscrit. De récents travaux montrent qu'au-delà de la régulation de certaines fonctions des cellules immunitaires, et de part leur présence dans l'ensemble des tissus vascularisés de l'organisme, les CSMs se comporteraient comme des cellules sentinelles de l'immunité innée, pouvant détecter la présence d'agents pathogènes dans l'organisme et participant à la résolution de l'infection^{38,45}. L'environnement inflammatoire qui apparaît à la suite d'une infection ou d'une atteinte tissulaire ne stimulerait pas uniquement les cellules de l'immunité innée mais également les cellules stromales et notamment les CSMs résidentes⁴⁶. Ce rôle des CSMs en tant que cellules de l'immunité innée a été caractérisé dans des modèles de septicémie dans lesquels l'injection intraveineuse de CSMs favorisait la survie des souris^{47,48}. Cette activation est la conséquence de l'expression à la surface des CSMs des *Toll Like Receptors* (TLRs). En effet, elles expriment les ARNm des TLRs 1, 2, 3, 4, 5 et 6 et moins clairement des TLRs 7 à 10 dans le tissu adipeux et dans la

moelle et au niveau protéique TLR2, 3, 4, 7 et 9⁴⁹. L'hypoxie augmente les transcrits TLR1, 2, 5, 9 et 10. Le LPS diminue TLR2 et 4 de progéniteurs ostéoblastiques dérivés de MSCs. L'activation des CSMs par les TLR stimule des voies dépendantes (par les TLR 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9) et non dépendantes (par le TLR3) de MyD88 conduisant à l'activation des voies NFkB, MAPK, PI3K induisant la synthèse de plusieurs cytokines CXCL-10, IL-6 et IL-8, notamment, confirmant que ces expressions de TLR par les MSCs sont bien fonctionnelles.

Tout comme les macrophages, les CSMs acquièrent, suite à l'activation des TLRs, un phénotype différent en fonction du niveau de l'inflammation, leur conférant une activité pro- ou anti-inflammatoire. Dans la phase aiguë inflammatoire, les CSMs adoptent un phénotype pro-inflammatoire inhibant la différenciation des monocytes et des macrophages M1 (pro-inflammatoires) en M2 (anti-inflammatoires) et participent ainsi à la mise en place d'une réponse immunitaire adéquate. Le passage à une inflammation secondaire permettant la régénération tissulaire est contrôlé par certains médiateurs et particulièrement par l'*l'indoleamine 2,3-dioxygénase* (IDO). IDO est produit et sécrété par les CSMs en réponse à un cocktail de cytokines proinflammatoires et induirait un changement phénotypique des macrophages M1 en M2 et une forte inhibition de la prolifération des lymphocytes T^{50,51}. Par conséquent, dans un second temps, les CSMs acquièrent un phénotype anti-inflammatoire et participent ainsi à la résolution de l'inflammation. Finalement, les CSMs communiquent avec les cellules de l'immunité innée et semblent faire partie intégrante de ce système.

II.3 Caractéristiques et mécanismes d'action des cellules souches mésenchymateuses

II.3.1 La transdifférenciation

Pendant longtemps, on a pensé que les effets bénéfiques de la greffe des CSMs étaient dus à leur capacité de transdifférenciation. Des études ont montré que les CSMs étaient effectivement capables d'acquérir les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des cellules constituant l'organe hôte. Les premiers essais cliniques utilisant les CSMs faisaient appel à leur plasticité afin de remplacer les cellules spécialisées mortes d'un tissu⁵². Aujourd'hui, il semble que ce mécanisme ne soit plus le principal effet bénéfique induit par les CSMs dans la régénération tissulaire. Ceci s'explique notamment par l'inadéquation entre la trop faible proportion de CSMs greffées participant à ces mécanismes de transdifférenciation et les effets bénéfiques observés. Cependant, des méthodes ont permis d'augmenter la quantité de CSMs efficacement incorporées au tissu hôte notamment pour des types cellulaires appartenant aux voies classiques de différenciation des CSMs. C'est particulièrement le cas dans le domaine de la réparation osseuse et articulaire. La première fait appel à une association entre les CSMs et le développement de supports en 3 dimensions poreux et biodégradables, servant de soutien à la colonisation, la croissance et la différenciation cellulaires au niveau de la fracture osseuse⁵³. La seconde repose sur l'injection de CSMs dans des gels de collagène ou d'acide hyaluronique⁵⁴.

II.3.2 L'activité paracrine

Les récents travaux de thérapie cellulaire utilisant les CSMs indiquent que les effets bénéfiques observés suite à la greffe des cellules sont principalement due à leur activité paracrine. Les CSMs produisent un large panel de molécules telles que des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance leur conférant des propriétés intéressantes dans l'homéostasie et la réparation tissulaire. Elles produisent notamment des facteurs de croissance proangiogéniques, anti-apoptotique ou encore mitogénique (VEGF, HGF, b-FGF et IGF-1), anti-fibrotique (MMP-1/2/9, plasminogen activator). Elles sécrètent également des facteurs impliqués dans la migration et la prolifération des monocytes (M-CSF et CCL2) ainsi que dans le recrutement des cellules progénitrices endogènes. La récente découverte de leur

localisation périvasculaire au sein des tissus conforte leur rôle de modulateurs cellulaires au travers des facteurs qu'elles sécrètent ouvrant des perspectives pour de nombreuses applications.

II.3.2.1 Stimulation de l'angiogenèse

Les CSMs possèdent un pouvoir angiogénique important⁵⁵. L'apport d'oxygène au tissu via la restauration d'un réseau vasculaire est un paramètre primordial dans la réparation et dans la restauration de la fonction d'un organe. Certains facteurs produits et sécrétés par les CSMs sembleraient majoritairement responsables de cet effet. Des molécules ont été identifiées dans leur sécrétome comme ayant un rôle prépondérant sur l'angiogenèse : VEGF, FGF-2, angiopoïétine-1 (Ang-1), CCL2, Il-6, le placenta growth factor (PLGF) ou encore la protéine *cystein-rich, angiogenic inducer 61 (Cyr61)*^{45,56-60}. Outre le fait qu'elles soient bien plus nombreuses que celles de la moelle, les CSMs dérivées du tissu adipeux sont celles qui ont le pouvoir angiogénique le plus important et partage avec les cellules endothéliales des progéniteurs communs⁵⁵. De nombreuses études montrent que le sécrétome des CSMs a un effet direct sur les cellules endothéliales en favorisant leur prolifération⁵⁶ et leur migration⁶¹ *in vitro*. De plus, des travaux suggèrent que les facteurs libérés par les CSMs préservent et stabilisent les vaisseaux déjà formés en agissant comme des péricytes⁶². Les CSMs semblent agir sur les différentes étapes de l'angiogenèse, du recrutement des cellules endothéliales à la stabilisation des vaisseaux matures.

L'activité proangiogénique des CSMs est un des mécanismes principaux responsables des effets bénéfiques observés dans les pathologies d'origine ischémiques. Elles sont notamment très utilisées dans le traitement des ischémies cardiaques et rénales, montrant un effet majeur, d'une part, sur la restauration fonctionnelle de la filtration glomérulaire dans des modèles d'insuffisance rénale chronique⁶³ et, d'autre part, sur la fraction d'éjection ventriculaire dans des modèles d'infarctus du myocarde⁶⁴. Dans la suite des travaux de Planat-Benard en 2004, un essai clinique de phase 1 a été réalisé afin de restaurer un réseau vasculaire chez des patients présentant une ischémie critique d'un membre. L'injection intramusculaire autologue de CSMs dérivées du tissu adipeux chez 7 patients semble accélérer la résorption des ulcères liés à l'ischémie⁶⁵. L'utilisation des CSMs dérivées du tissu adipeux semblent très prometteuse pour traiter ces atteintes ischémiques sévères pour lesquels il n'existe pas de traitement efficace.

II.3.2.2 Effet neuroprotecteur

Les CSMs ont récemment été caractérisées dans les tissus nerveux et isolées à partir du cerveau. Elles sont présentes autour de petits vaisseaux comme les péricytes et constituent ainsi une nouvelle population de cellules souches du cerveau distincte des cellules souches neuronales. Ceci évoque l'hypothèse d'un rôle des CSMs dans l'homéostasie des tissus nerveux (Figure 11).

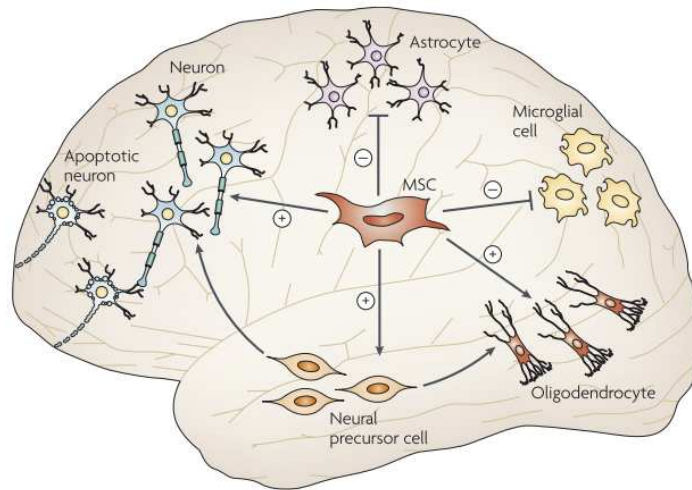


Figure 12: Effets stimulants (+) ou inhibiteur (-) des CSMs sur les différentes cellules résidentes du cerveau¹⁶

Des études ont bien montré dans différents modèles de lésions cérébrales que la transplantation de CSMs préservait une densité de cellules neuronales dans la zone lésée^{66,67}. Bien que des travaux aient été focalisés sur la plasticité des CSMs et leur capacité à se transdifférencier en neurones ou en cellules gliales⁶⁸ (Figure 12), les effets majeurs neuroprotecteurs des CSMs sont majoritairement dus à leur activité paracrine. En effet, des études d'électrophysiologie ou d'imagerie calcique montrent un défaut de fonctionnalité des neurones incorporées au tissu provenant de la différenciation des CSMs⁶⁹.

L'analyse du sécrétome a montré que les CSMs produisent différents facteurs ayant des effets directs sur les cellules neuronales, principalement des facteurs de croissance mais également des cytokines/chimiokines : BDNF, CNTF, bFGF, FGF8, FGF20, GDNF, IGF1, HGF, IL6, NGF, CXCL12, G-CSF, TGF- β 1, TNF- α , TRKC and VEGF. La production en facteurs neurotrophiques des CSMs varie en fonction des stimuli reçus par le microenvironnement.

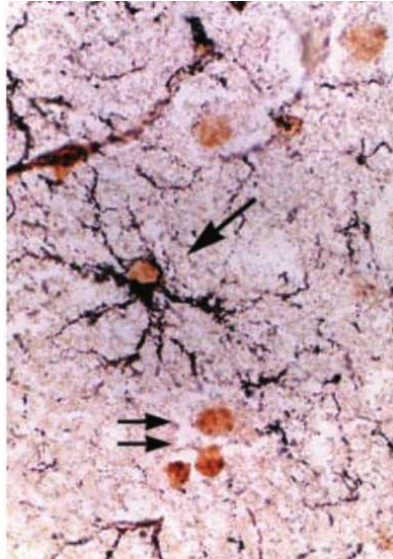


Figure 13: Astrocytes provenant de la différenciation de CSMs, doublement marqués au BrDU et anticorps anti-GFAP (flèche noire)⁶⁸.

L'exposition des CSMs à certaines cytokines proinflammatoires, à des cellules apoptotiques, à un environnement hypoxique ou encore à des microglies activées potentialise l'activité neuroprotectrice des CSMs en induisant une augmentation du niveau de facteurs neurotrophiques sécrétés⁷⁰⁻⁷². Les CSMs isolées à partir de différents tissus et stimulées ou non diffèrent par rapport au niveau d'expression en facteurs neurotrophiques.

En fonction des modèles expérimentaux d'atteinte neuronale utilisés, certains facteurs sécrétés par les CSMs sont identifiés comme ayant un impact prépondérant parmi les différentes molécules du sécrétome. C'est le cas, par exemple, du BDNF qui a été identifié dans le cadre de la maladie de Huntington comme ayant un effet majeur⁷³. Les facteurs trophiques directs agissent par une réduction de l'apoptose des neurones, une augmentation de la formation de neurites et/ou une augmentation de la formation des connections synaptiques. Plusieurs essais cliniques évaluant l'impact clinique de la greffe des CSMs au cours d'atteintes neuronales telles que : les AVC, les atteintes de la moelle épinière, la sclérose en plaque ainsi que la maladie de Parkinson sont actuellement en cours.

II.3.2.3 Stimulation de la prolifération des CS endogènes

Un autre mécanisme contribuant aux effets bénéfiques des CSMs dans la régénération et la réparation tissulaire a été rapporté par différentes équipes. Il semble qu'après injection, les

CSMs soient capables d'activer la prolifération de cellules souches résidentes au sein de l'organe endommagé. Manuguerra et al. montrent par une approche immunohistochimique que l'injection de CSMs et surtout de leur sécrétome dans la chambre antérieure de l'œil induit une régénération du trabéculum, filtre dynamique régulant la pression intraoculaire, mis en évidence par l'expression du marqueur de prolifération Ki67 dans les cellules souches endogènes latentes (nestin positives)⁷⁴ (Figure 13).

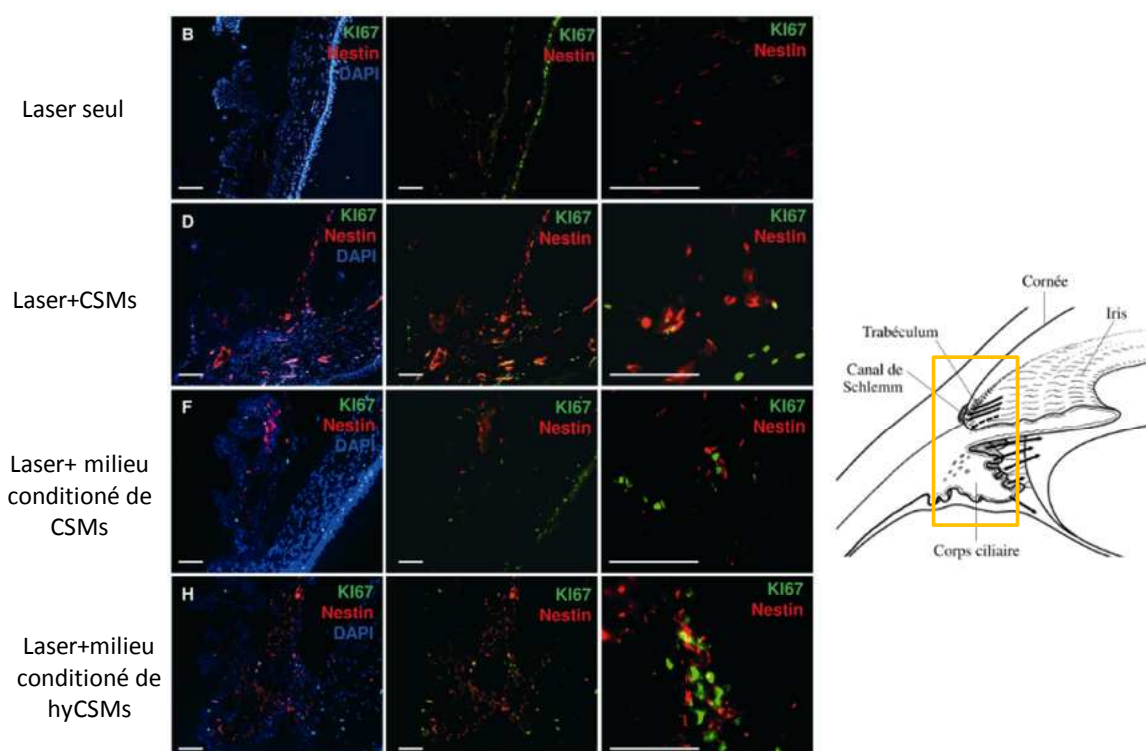


Figure 14 : Activation de la prolifération, figurée par un marquage Ki67 (vert), au niveau de l'angle irido-cornéen chez des souris glaucomateuses ayant reçu l'injection de CSMs ou de leur milieu conditionné. Le noyau des cellules est marqué au DAPI (bleu) et les cellules Nestin+ sont en Rouge⁷⁴.

Dans un modèle d'infarctus du myocarde, une étude décrit le rôle des CSMs sur la réparation tissulaire par recrutement des cellules progénitrices cardiaques au travers de la sécrétion de la chimiokines CXCL12⁷⁵. Une autre étude montre que les CSMs sont également capables d'augmenter de façon significative la prolifération de cellules souches neurales résidentes chez le rat après une congestion cérébrale⁷⁶. Ces observations sont en accord avec la description de leur rôle physiologique sur l'homéostasie tissulaire, notamment au niveau de la

moelle osseuse. Au travers des facteurs qu'elles sécrètent, les CSMs contrôlent l'entrée des CSHs en division asymétrique.

II.3.3 Immunomodulation

L'une des propriétés la plus décrite des CSMs est leur interaction avec les cellules de l'immunité innée et adaptative. Les CSMs ont été naturellement considérées comme des candidates intéressantes dans le traitement des désordres immunitaires. Ces effets immunorégulateurs ont été largement décrits *in vitro* et *in vivo* et sont liés à des interactions directes et indirectes avec les cellules immunitaires au travers des facteurs qu'elles sécrètent (Tableau III). Certains facteurs sécrétés par les CSMs tels que l'enzyme l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO)⁷⁷, la prostaglandine E2 (PGE2)⁷⁸, le *TNF- α -stimulated gene/protein 6* (TSG-6)⁷⁹ ou encore le *transforming growth factor* (TGF- β)⁸⁰ ont été identifiés comme ayant un rôle majeur sur l'inhibition des lymphocytes T, la maturation des cellules dendritiques (CDs), la prolifération des cellules *natural killer* (NK) ou encore en induisant l'expression de IL-10 par les lymphocytes T régulateurs.

Facteurs ayant un effet sur les cellules de l'immunité innée et adaptative	Cellules cibles
IL-10	Macrophages, Neutrophiles, CDs, Lymphocytes Th1, Treg,
IL-6	Neutrophiles, Monocytes, CDs, B, Lymphocytes Th2, Treg, Th17
TGF- β	Macrophages, NK, CDs, lymphocytes B, T, Treg
CCL2	Macrophages, lymphocytes Th2, Th17
CCL5	Neutrophiles, Monocytes, CDs, lymphocytes Th1, Treg,
IDO	Monocytes, CDs, Lymphocytes B, T, Treg
VEGF	CDs, Lymphocytes Th1, Th17, Treg
PGE2	Macrophages, Monocytes, NK, CDs, Lymphocytes T

Tableau III : Facteurs principaux sécrétés par les CSMs ayant un effet sur les cellules de l'immunité innée et adaptative

Krampera et al. ont observé que, dans un système *in vitro* de coculture, les CSMs inhibaient bien la prolifération des lymphocytes T mais que cet effet n'apparaissait qu'après trois jours de culture seulement. Cette observation suggère qu'il existe une communication réciproque

entre les deux types cellulaires à l'origine de l'effet inhibiteur des CSMs⁸¹. En effet, Il est aujourd'hui clairement défini que les CSMs ne sont pas intrinséquement immunorégulatrices mais qu'elles décrivent un effet inhibiteur sur les cellules immunitaires après avoir été « éduquées » (*licensing*) par des stimuli⁸² (Figure 14). En effet, la propriété de régulation de la réaction immunitaire par les CSMs est potentialisée par exposition à différentes cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN⁸³, le TNF⁸² ou l'IL-1 α ⁸⁴ ou β ⁸⁵. L'IFN- γ semble être le facteur majeur pour stimuler l'activité immunomodulatrice des CSMs en stimulant notamment la production de IDO par les cellules⁷⁷ et son effet est potentialisé par l'ajout de TNF- α ^{82,86}. Ce « licensing » des cellules *in vitro* simule l'environnement inflammatoire et immunitaire dans lequel les CSMs vont être intégrées lors de leur utilisation pour traiter des pathologies où les systèmes immunitaire et inflammatoire sont suractivés telles que les réactions du greffon contre l'hôte (GvHD)⁸⁷⁻⁹⁰, les pathologies auto-immunes (syndrome de Gougerot-Sjögren⁹¹, encéphalite autoimmune⁹²) et les pathologies inflammatoires chroniques (colite ulcéreuse⁹³, maladie de Crohn⁹⁴).

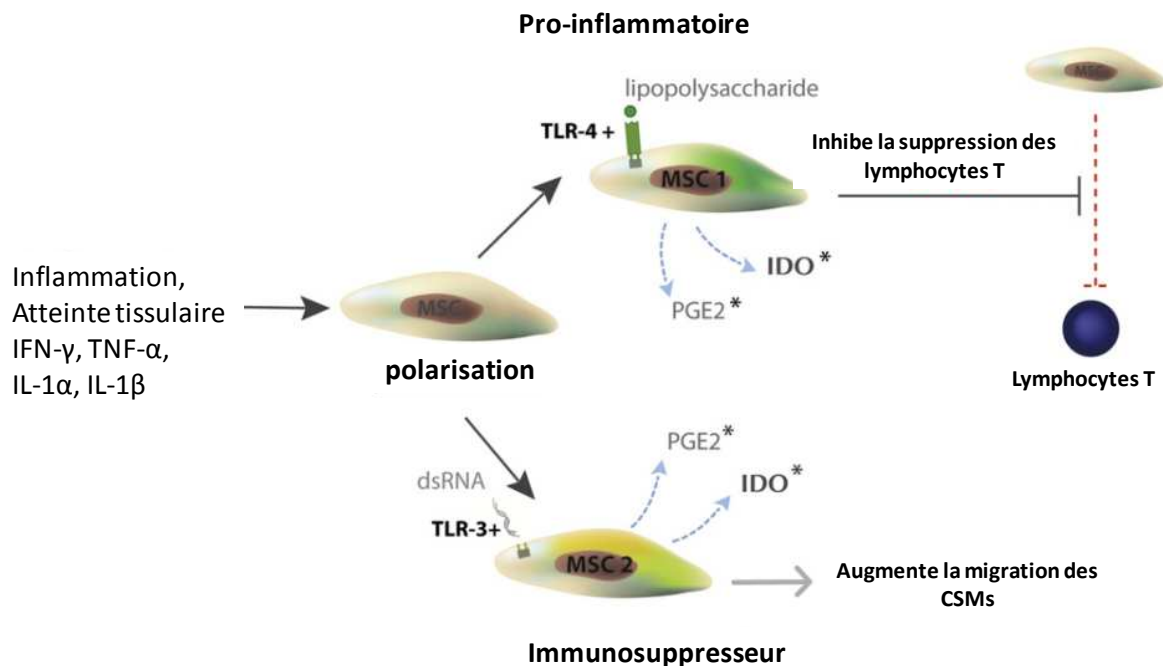


Figure 15: Effet de l'environnement inflammatoire sur le phénotype des CSMs⁹⁵. PGE2 : prostaglandine E2 ; IDO : l'indoleamine 2,3-dioxygénase

Leur efficacité en tant qu'immunosuppresseurs est à l'origine de la mise en place de nombreux essais cliniques visant à remplacer les traitements immunosuppresseurs qui présentent des effets indésirables majeurs au long cours notamment dans la réaction du greffon contre l'hôte (GvHD). Une étude clinique de phase II montre l'efficacité des CSMs à inhiber la réaction aigue de la GvHD chez des patients ayant reçu une transplantation allogénique de CSHs et résistant aux stéroïdes⁸⁸. Plus récemment une autre étude clinique sur une cohorte de 37 enfants atteint d'une GvHD aigue et résistants aux stéroïdes, conclue à un effet favorable de l'injection de CSMs⁹⁶.

Conclusion

Bien que l'intérêt majeur de l'utilisation des CSMs provienne de leur activité paracrine, les effets bénéfiques largement décrits dans différents contextes pathologiques sont souvent la résultante d'une combinaison de plusieurs mécanismes : la différenciation, la capacité pro-régénérative et l'effet immunomodulateur. L'analyse du sécrétome afin de déterminer le facteur principalement responsable des effets observés est un enjeu majeur. Cependant, l'effet bénéfique global sur l'inhibition de la dégénérescence ou sur la restauration fonctionnelle d'un tissu ou d'un organe provient certainement à la fois d'une action directe sur la survie et la fonction des cellules spécialisées mais également d'une action indirecte sur le microenvironnement tissulaire. Par exemple, dans le cadre de la neuroprotection induite par les CSMs, au-delà de l'effet direct sur la survie et la croissance des neurones, la diminution de l'inflammation, le recrutement des progéniteurs neuronaux endogènes, la néoangiogenèse ainsi que le remodelage de la matrice extracellulaire (ECM) participent largement à la restauration fonctionnelle du tissu cible.

III. Les CSMs et leurs applications thérapeutiques dans les pathologies oculaires

L'œil est le siège de nombreuses perturbations physiopathologiques aiguës ou chroniques, réversibles ou non pouvant conduire à des pertes partielles ou totales de la vision ou encore à des altérations majeures de la qualité de vie des patients. La recherche de stratégies thérapeutiques innovantes afin de corriger ces atteintes constitue un important enjeu actuel de la recherche en ophtalmologie. Les thérapies génique et cellulaire sont des outils thérapeutiques puissants mais la maîtrise du devenir et de la dissémination des éléments injectés est un paramètre limitant leur transposition à l'homme. La particularité de l'œil par son isolement anatomique, d'une part, et par sa facilité d'accès, d'autre part, permet d'envisager l'utilisation de telles thérapies déjà développées dans d'autres tissus et dont l'application clinique reste compliquée⁹⁷.

Le premier essai clinique utilisant les CSMs est apparu en 1995⁹⁸ et leur utilisation s'est développé au début des années 2000. Aujourd'hui, nous recensons plus de 400 essais cliniques dans des domaines cliniques très variés tels que des pathologies inflammatoires ou immunologiques (maladie de Crohn, réaction du greffon contre l'hôte GvHD), fibrotiques (fibrose cardiaque, hépatique ou rénale) ou encore des troubles neurologiques (ischémies cérébrales, sclérose en plaques, maladie d'Alzheimer).

Dans le domaine de l'ophtalmologie, les premières études précliniques sont apparues plus récemment en 2007, dans des modèles de dégénérescence rétinienne. Depuis, les études se sont étendues à de nombreux désordres ophtalmologiques : glaucome, pathologies de la surface oculaire (cicatrisation cornéenne, prévention du rejet de greffe cornéen, sécheresse oculaire) ou encore pathologies inflammatoires ou immunologiques (uvéïtes, syndrome de Gougerot-Sjögren).

Identification	Pays	Statut	Nom de l'étude	phase	Nombre de participants estimé	Année de fin estimée	Pathologie
NCT01920867	USA	En recrutement	Stem Cell Ophthalmology Treatment Study (SCOTS)	NR	300	2017	Atteintes rétiniennes Dégénérescence maculaire liée à l'âge Dystrophie rétinienne héréditaire Atteintes du nerf optique Glaucome
NCT01562002	Espagne	En cours	Safety Study of Stem Cell Transplant to Treat Limbus Insufficiency Syndrome	1/2	30	2014	Syndrome de déficience en cellules souches limbiques
NCT00953485	Chine	Non renseigné	Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Transplantation for Primary Sjögren's Syndrome (pSS)	1/2	20	2011	Syndrome de Gougerot-Sjögren
NCT01531348	Thaïlande	Recrutement par invitation	Feasibility and Safety of Adult Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells by Intravitreal Injection in Patients With Retinitis Pigmentosa	1	10	2014	Rétinite pigmentaire
NCT01914913	Inde	En recrutement	Clinical Study to Evaluate Safety and Efficacy of BMMNC in Retinitis Pigmentosa	1/2	15	2016	Rétinite pigmentaire
NCT01560715	Brésil	terminé	Autologous Bone Marrow-Derived Stem Cells Transplantation For Retinitis Pigmentosa (RETICELL)	2	50	2014	Rétinite pigmentaire
NCT02016508	Egypte	En recrutement	Safety Study of Use of Autologous Bone Marrow Derived Stem Cell in Treatment of Age Related Macular Degeneration	1/2	1	2015	Dégénérescence maculaire liée à l'âge

Tableau IV : Recensement des études cliniques utilisant les CSMs en ophtalmologie (<http://www.clinicaltrials.gov>)

A l'heure où les premières études cliniques apparaissent, notamment dans le traitement des rétinites pigmentaires, de la DMLA ou encore des insuffisances limbiques (Tableau 3), il est intéressant de réaliser un état des lieux des différentes utilisations des CSMs en ophtalmologie. Cette partie de la thèse a pour but de synthétiser l'accumulation des données précliniques de thérapie cellulaire utilisant les CSMs en ophtalmologie et de discuter du rationnel pour leurs différentes applications.

III.1 CSMs et dégénérescence rétinienne

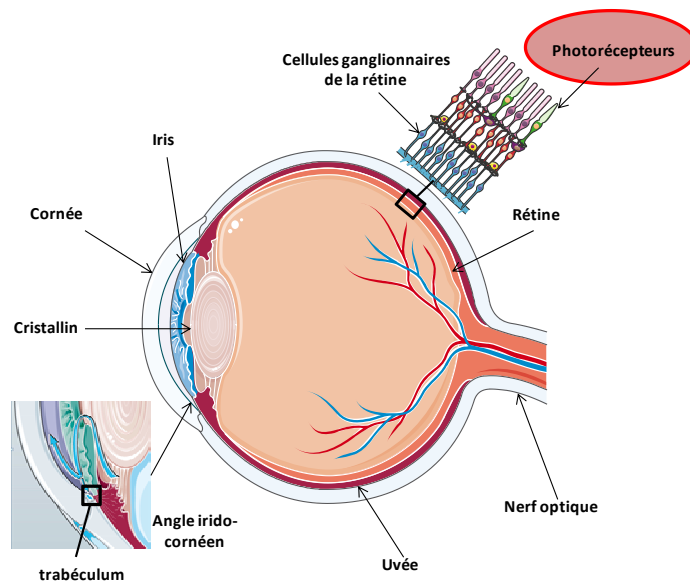


Figure 16 : Tissu atteint au cours de dégénérescence rétinienne

Les dégénérescences rétiniennes sont des pathologies qui touchent les cellules photosensibles de la rétine, c'est-à-dire les photorécepteurs. Les formes les plus fréquentes de dégénérescences rétiniennes sont la rétinite pigmentaire (RP), le syndrome de Usher (pathologie généralement congénitale associant une surdité neurosensorielle et une rétinite pigmentaire entraînant une perte de la vision) et les dégénérescences maculaires liées à l'âge (DMLA). Ces maladies causent diverses dégradations des photorécepteurs évoluant différemment en fonction de l'origine de la dégénérescence (héréditaire ou non). Toutes ces formes de dégénérescences rétiniennes ont en commun le fait qu'elles ne peuvent être traitées que très partiellement ou qu'elles sont incurables.

Beaucoup d'espoir repose sur les thérapies géniques ciblées afin de pallier le déficit causé par une protéine non fonctionnelle comme dans la rétinite pigmentaire avec le gène RPE65 ou le syndrome d'Usher avec le gène MYO7A ou encore de faire produire constitutivement par les cellules de la rétine les molécules thérapeutiques (anti-VEGF pour le traitement de la DMLA)⁹⁷. Les thérapies cellulaires constituent également une stratégie thérapeutique très intéressante pour ce type de pathologie dégénérative afin de remplacer les cellules fonctionnelles mortes. Récemment, une étude a montré la récupération d'aptitudes visuelles par transplantation de photorécepteurs fonctionnels dans un modèle murin de dégénérescence rétinienne⁹⁹.

Les cellules souches, et notamment les CSMs, sont également présentées comme étant un espoir pour favoriser la réparation des tissus nerveux. En effet, il a été montré que les CSMs peuvent se différencier en neurones avec l'acquisition de marqueurs caractéristiques¹⁰⁰⁻¹⁰³. Cette source importante de neurones que constitue alors les CSMs font d'elles un espoir majeur dans le traitement de nombreuses pathologies neurodégénératives. De manière générale dans la réalisation de protocoles de thérapie cellulaire à visée régénératrice, deux paramètres majeurs sont à vérifier : la réelle différenciation des cellules en cellules spécialisées et leur intégration dans le tissu en formant des connections intercellulaires¹⁰⁴.

Des études ont pu mettre en évidence la différenciation des CSMs en cellules rétinienne et notamment en photorécepteurs-*like* avec l'acquisition de l'expression génique et protéique de marqueurs spécifiques des photorécepteurs comme la rhodopsine, CRX (Cone Rod Homeobox, un facteur de transcription des photorécepteurs) ou la recoverine. Cette plasticité des CSMs a été observée *in vitro* à partir de CSMs isolées de la conjonctive¹⁰⁵ et *in vivo* après injection sous-rétinienne dans un modèle de dégénérescence rétinienne chez le rat¹⁰⁶. Ces résultats ouvrent la possibilité de thérapie régénératrice dans les pathologies impliquant la mort des photorécepteurs comme la RP, la DMLA ou encore le syndrome d'Usher. Il subsiste cependant encore des limites quant à l'utilisation des CSMs afin de remplacer des populations cellulaires neuronales. En effet, une polémique subsiste quant à la réelle capacité des CSMs à se différencier en neurones. En effet, les protocoles de différenciation des CSMs en neurones utilisent souvent des substances toxiques. La réponse cellulaire à ces stimulations en adoptant un phénotype de cellules neuronales semble d'avantage être une réponse aux stress toxiques qu'à une réelle différenciation en cellules nerveuses fonctionnelles¹⁰⁷. De plus, malgré l'acquisition de l'expression de marqueurs neuronaux spécifiques, les neurones issus de la transdifférenciation des CSMs semblent faiblement efficaces. En effet, bien que certaines études aient montré la capacité des neurones dérivés des CSMs à réaliser des synapses avec les cellules voisines¹⁰⁸, il n'a pas été montré qu'elles pouvaient répondre à des stimulations par des neurotransmetteurs. L'injections intravitréennes et sous-rétiniennes de CSMs dans des modèles d'altération de la rétine par laser¹⁰⁹ ou par ischémie¹¹⁰ montrent bien une intégration anatomique des CSMs principalement au niveau de la couche des cellules ganglionnaires ou de la rétine externe en fonction du site d'injection. Il n'a cependant pas encore été montré que la faible proportion de CSMs anatomiquement intégrées dans la rétine, était capable de faire des synapses avec d'autres cellules. Les mécanismes sous-jacents conduisant à la différenciation des CSMs en neurones sont encore très mal connus et des doutes persistent sur

la pertinence biologique de leur différenciation *in vivo*. Par conséquent, des protocoles optimisés doivent être développés pour favoriser l'intégration des CSMs dans le tissu hôte afin de lui restituer sa fonctionnalité et pour étudier les mécanismes précis impliqués dans la différenciation des CSMs¹¹¹.

De nombreuses études ont été focalisées sur l'activité paracrine des CSMs dans le cadre des pathologies neurodégénératives plutôt que sur leur plasticité. En effet, le faible niveau d'intégration des CSMs et le défaut d'efficacité des cellules neuronales issues de la différenciation des CSMs ne permettent pas d'expliquer les effets neuroprotecteurs majeurs apportés par la transplantation de CSMs. Or, les CSMs sécrètent un large panel de facteurs trophiques ayant des propriétés antiapoptotiques, angiogéniques ou encore induisant la prolifération/différenciation des précurseurs et des cellules souches intrinsèques aux tissus mais également des propriétés immunomodulatrices, antifibrotiques ou encore chimioattractantes^{112,113}. Certains facteurs ont montré qu'ils avaient des effets neurotrophiques directs : neurogéniques, neuroprotecteurs et synaptogéniques ou indirects : angiogénique, antifibrotique et antiapoptotique participant à la réparation/protection des tissus nerveux^{114,115} (Figure 15).

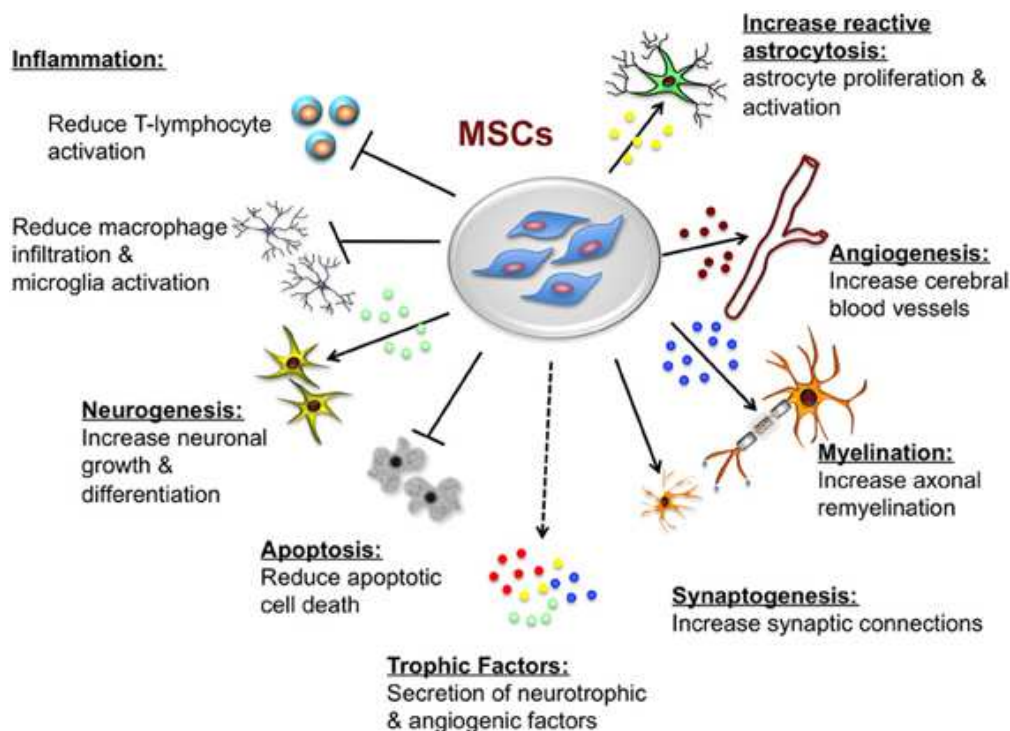


Figure 17: Mécanismes d'action des CSMs dans la régénération neuronale¹¹⁶

Plusieurs études ont montré que la transplantation de CSMs favorisait directement la survie des photorécepteurs dans différents modèles de dystrophie rétinienne (modèle rhodopsin-KO¹¹⁷, Royal Model of Surgeons¹¹⁸) mais également dans des modèles de DMLA en favorisant la survie des cellules épithéliales pigmentaires de la rétine¹¹⁹. L'ensemble de ces résultats précliniques a abouti à la mise en place de trois essais cliniques de faisabilité et de tolérance actuellement en cours dans la prise en charge des rétinites pigmentaires (Tableau 3)¹⁰⁴. De nombreux travaux ont essayé d'identifier les principaux facteurs responsables des effets bénéfiques du sécrétome des CSMs sur les tissus nerveux, notamment au travers des facteurs de croissance neurotrophiques sécrétés par les cellules (BDNF, NGF, VEGF, et bFGF). Cependant, les effets directs connus de ces molécules sur les tissus neuronaux semblent être amplifiés par l'association à d'autres molécules du sécrétome des CSMs, notamment ceux responsables de l'activation de voies antiapoptotiques, du recrutement des progéniteurs neuronaux endogènes ou encore du remodelage des tissus de soutien^{120,121}. Il est très probable que la capacité des CSMs à protéger et réparer les tissus nerveux soit due à un large cocktail de facteurs agissant directement sur les neurones et sur leur microenvironnement.

III.2 CSMs et glaucome

III.2.1 Généralités sur le glaucome primitif à angle ouvert

Le glaucome primitif à angle ouvert (GPAO) représente 50 à 70 % de l'ensemble des glaucomes. Le GPAO est une neuropathie optique généralement précédée puis associée à une hypertension oculaire. Cette pathologie toucherait entre 0,5 à 1% chez les adultes de plus de 40 ans en Europe et en Afrique du Nord. Le glaucome est l'une des trois premières causes de cécité à travers le monde avec la rétinopathie diabétique et la DMLA et affecterait entre 67 et 90,8 millions d'individus au niveau mondial¹²².

III.2.1.1 La physiopathologie :

L'élévation de la pression intraoculaire est le principal facteur de risque induisant la dégénérescence des cellules ganglionnaires rétinienne (CGRs)¹²³. Les mécanismes précis de l'apoptose des CGRs ne sont pas encore élucidés, cependant des mécanismes de modifications vasculaires et de remodelage tissulaire seraient impliqués¹²⁴. Les astrocytes et les cellules microgliales de la rétine pourraient également jouer un rôle central dans la transformation du

stress lié à l'augmentation de la PIO en une réponse cellulaire responsable d'un remodelage tissulaire, notamment au travers de la production de cytokines et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)¹²⁵.

L'augmentation de la PIO est due à une dégénérescence du trabéculum. Le trabéculum est un filtre dynamique qui régule l'écoulement de l'humeur aqueuse (HA). Il tapisse l'angle irido-cornéen sur la totalité de sa circonférence. C'est un tissu conjonctif lacunaire, composé d'un empilement de lamelles entourées de cellules endothéliales (cellules trabéculaires) formant ainsi des espaces intertrabéculaires de plus en plus fins en approchant du canal de Schlemm (Figure 16). La partie du trabéculum la plus proche du canal de Schlemm est appelé le trabéculum juxtacanaliculaire et constitue le principal site de résistance à l'écoulement de l'HA.

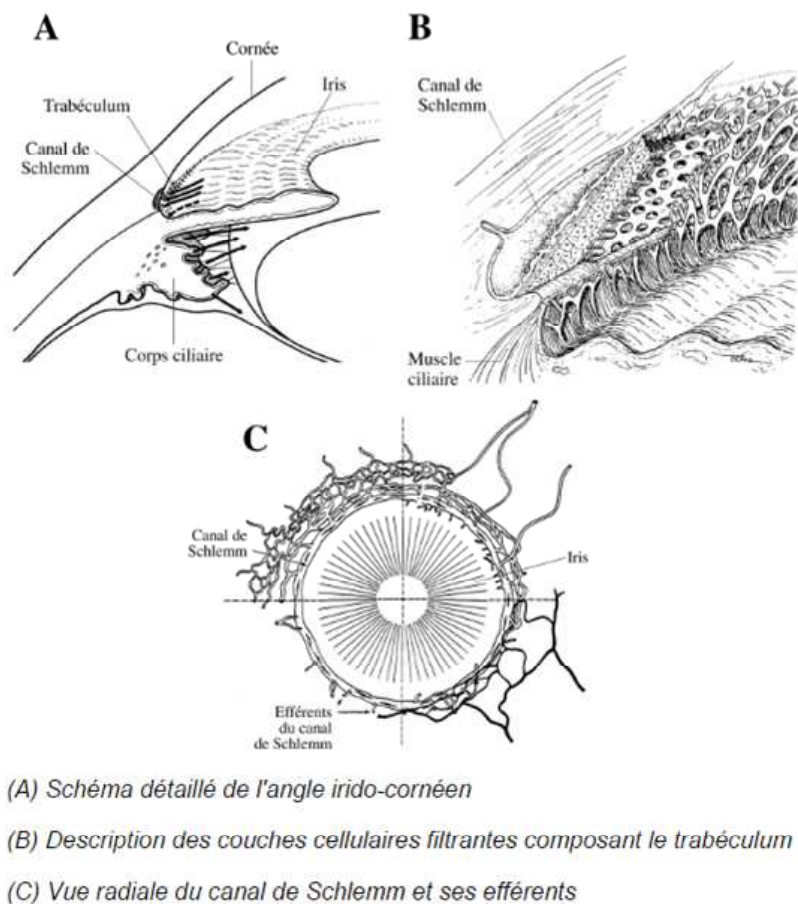


Figure 18 : Anatomie de l'angle irido-cornéen, du trabéculum et du canal de Schlemm¹²⁶

Les mécanismes de dégénérescence du trabéculum ne sont pas bien connus mais ils associent une raréfaction des cellules trabéculaires et un remodelage de la MEC¹²⁷. Il semblerait que la diminution du nombre de cellules trabéculaires soit liée à des mécanismes d'apoptose, cependant les mécanismes initiaux conduisant à cette mort ne sont pas connus. Il a été identifié une concentration anormalement élevée de certaines cytokines telles que le TNF- α , l'IL-1 β ou encore le TGF- β et de métalloprotéinases telles que la MMP-2 et la MMP-3 dans le tissu trabéculaire et dans l'humeur aqueuse de patients glaucomateux^{128,129}.

Cette dégénérescence progressive du trabéculum provoque un défaut d'écoulement de l'HA. En effet, l'HA est éliminé à 90% par la voie trabéculo-canaliculaire au travers du trabéculum et à 10% par la voie dite uvéosclérale. La résistance à l'écoulement de l'HA par le trabéculum induit une élévation de la PIO majoritairement responsable de la mort des CGRs.

III.2.1.2 Prise en charge

La prise en charge du glaucome repose sur des stratégies thérapeutiques visant à faire baisser la PIO. Les collyres actuels sont principalement utilisés soit pour diminuer la production d'HA, c'est le cas des collyres ayant pour principe actif des molécules de la famille des β -bloquants, des inhibiteurs de l'anhydrase carbonique ou encore des agonistes adrénergiques, soit pour augmenter la résorption de l'HA, on retrouve des analogues des prostaglandines ainsi que des molécules myotiques (agonistes cholinergiques).

Bien que certaines études prospectives aient permis de confirmer la corrélation entre hypertension oculaire et progression de la pathologie glaucomateuse, de nombreux cas échappent aux traitements actuels. La combinaison de plusieurs molécules différentes n'empêche pas cet échappement thérapeutique qui pourrait s'expliquer par le fait qu'aucun traitement actuel ne cible le trabéculum lui-même afin de préserver son intégrité fonctionnelle.

III.2.2 Revue de l'utilisation des CSMs dans le glaucome

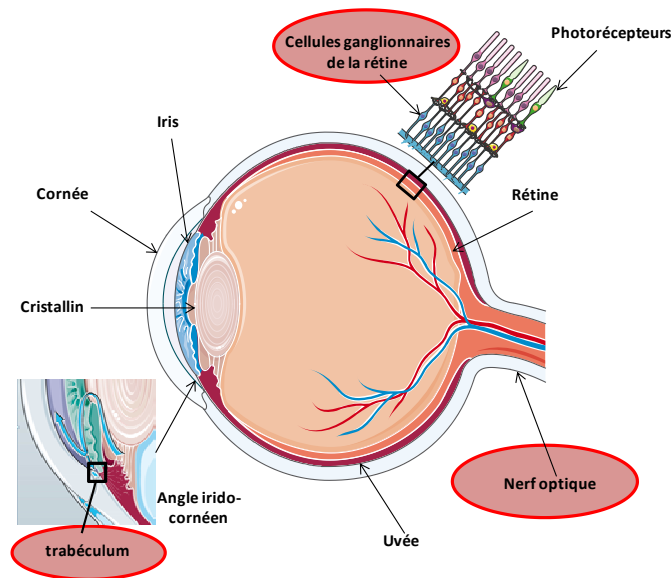


Figure 19 : Tissus atteints au cours de la pathologie glaucomateuse

La majorité des études précliniques dans le glaucome ont pour objectif de favoriser la survie des CGRs par l'utilisation de facteurs neurotrophiques. Les CSMs ont montré des effets neuroprotecteurs majeurs dans différents modèles de dégénérescence chronique comme les ischémies cérébrales (Andrews et al. 2008), la maladie de Parkinson¹³¹ ou encore la sclérose latérale amyotrophique¹³². Comme nous l'avons vu précédemment, ces effets sont dus à la production importante de facteurs neurotrophiques par les CSMs (BDNF, NGF, VEGF, bFGF, PDGF) potentialisés par la sécrétion de facteurs ayant des effets sur le microenvironnement des tissus nerveux^{120,121}. De nombreuses études précliniques ont déjà montré l'efficacité des CSMs pour protéger les CGRs dans des modèles d'écrasement¹³³ ou de transection du nerf optique¹³⁴ ainsi que dans des modèles d'hypertension oculaire par photocoagulation du trabéculum¹³⁵ et même *ex vivo* à partir d'explants rétiniens¹³⁶ (Figure 17). L'accumulation de ces données a abouti à la mise en place d'un premier essai clinique d'efficacité en 2013 (*Stem Cell Ophthalmology Treatment Study: SCOTS* ; NCT01920867; <http://clinicaltrials.gov/>; Tableau 3) visant à déterminer la meilleure voie d'injection des CSMs capable de favoriser au mieux leur effet neuroprotecteur.

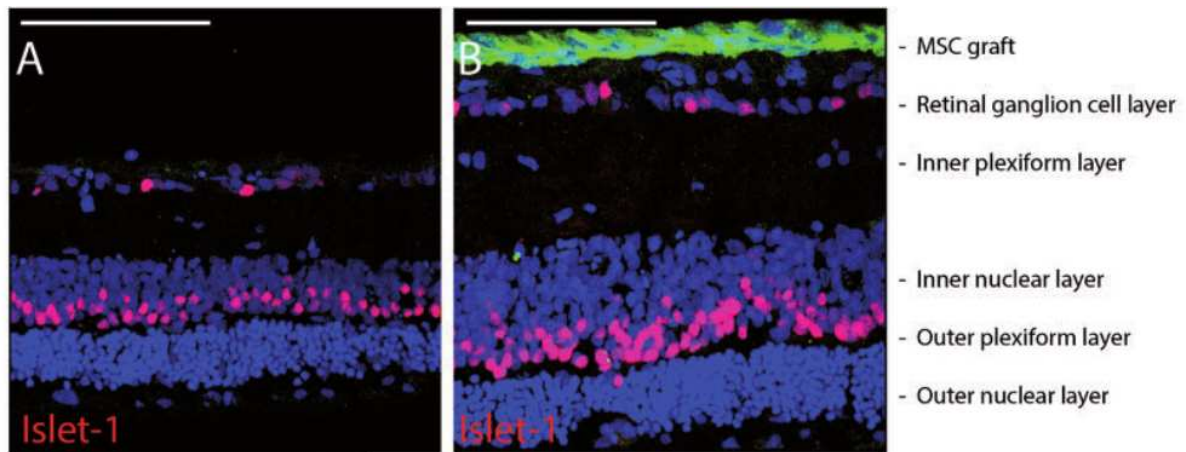


Figure 20: Protection des cellules ganglionnaires d'explant rétinien en coculture avec les CSMs (en vert), l'ensemble des noyaux des cellules de la rétine sont marqués au DAPI (bleu), les cellules en apoptose sont marquées au TUNEL (rose)¹³⁶.

Une étude récente a évalué l'effet de l'injection de CSMs dans la chambre antérieure dans un modèle murin de glaucome⁷⁰. Cette approche a pour but de restaurer les fonctions de filtration du trabéculum et ainsi de cibler le facteur de risque majeur de la dégénérescence des cellules nerveuses de la rétine, c'est-à-dire l'augmentation de la pression intraoculaire (PIO). L'injection des CSMs a permis d'induire la prolifération de cellules progénitrices latentes des procès ciliaires, favorisant ainsi la régénération du trabéculum, et donc de rétablir une PIO normale⁷⁴.

En démontrant un effet combiné sur les tissus des segments antérieur et postérieur de l'œil impliqués dans la physiopathologie glaucomateuse, le trabéculum et les cellules ganglionnaires de la rétine, et en favorisant la baisse de la PIO, principal facteur de neuroprotection dans le glaucome, les CSMs présentent un intérêt majeur qui ira croissant dans la prise en charge de cette pathologie.

III.3 CSMs et atteintes cornéennes

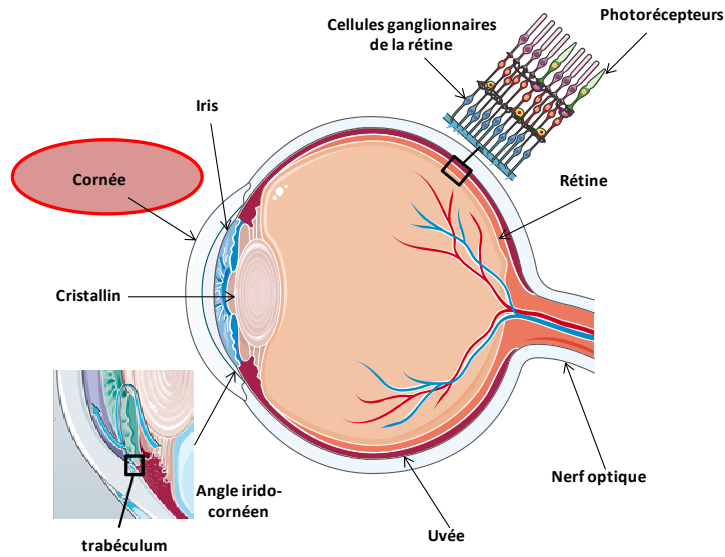


Figure 21 : Tissu atteint au cours des pathologie de la cornée

Les atteintes cornéennes sont la première cause de cécité à travers le monde. Elles peuvent être dues à des brûlures chimiques ou thermiques, des atteintes mécaniques, des ulcérations cornéennes, des déficiences en cellules souches limbiques ou encore des sécheresses ou des allergies oculaires sévères. Indépendamment de la cause, ces atteintes résultent toutes en une inflammation aiguë ou chronique de la surface oculaire. Les outils thérapeutiques à disposition sont limités, varient selon l'étiologie et peuvent aboutir à des greffes de cellules souches limbiques (CSLs) ou à des greffes de cornée. Les traitements anti-inflammatoires comme les stéroïdes présentent souvent une efficacité modérée et transitoire ne permettant pas de prévenir la perte consécutive des CSLs, cellules indispensables à l'autorenouvellement de l'épithélium cornéen. Malgré un taux important de réussite des greffes de CSLs et de cornées entières, ces approches thérapeutiques sont confrontées à un rejet immunologique important.

III.3.1 Insuffisance limbique et reconstruction cornéenne

Les atteintes cornéennes sont les pathologies ophtalmiques pour lesquelles l'utilisation des CSMs est la plus avancée. La physiologie de la cornée dans les atteintes cornéennes touchant le limbe ne permettant pas la reconstruction du tissu par lui-même, les greffes de cellules souches limbiques sont alors très utilisées. Il existe cependant des limites à la greffe de CSLs:

le risque de créer un déficit en CSLs de l'œil donneur controlatéral ou le risque de rejet avec nécessité d'utilisation de traitements immunosuppresseurs pour les greffes allogéniques lorsque les deux yeux sont touchés. La greffe de CSMs constitue ainsi une alternative intéressante à la greffe de CSLs par la facilité avec laquelle il est possible d'isoler et d'amplifier les CSMs et grâce à leurs propriétés immunosuppressives.

De nouveau, les CSMs sont utilisées dans un but de régénération tissulaire, pour leur plasticité et leur capacité à acquérir *in vitro* et *in vivo* un phénotype de cellules épithéliales et stromales cornéennes. Gu et al. ont pu montrer que les CSMs de lapin acquéraient le marqueur cytokératine 3 *in vivo* et *ex vivo* permettant la régénération de la cornée après transplantation¹³⁸. De même, Jiang et al. décrivent la capacité des CSMs de rat à acquérir une morphologie de cellules épithéliales et l'expression de la cytokératine 12 en coculture avec des cellules souches stromales (Jiang et al. 2010). Les CSMs semblent également capables d'acquérir l'expression de marqueurs de kératocytes (keratocan et lumican), de s'intégrer, de former des connexions avec le tissu hôte et enfin de participer au remodelage de la matrice extracellulaire chez des souris *lum*^{-/-} (n'exprimant pas le gène du lumican), améliorant ainsi la transparence de la cornée^{140,141}. De plus, des CSMs ont été isolées à partir du limbe décrit comme ayant un rôle de support au maintien de l'intégrité des niches de CSLs¹⁴², favorisant, *ex vivo*, l'expansion des cellules épithéliales limbiques¹⁴³ ou constituant la source de cellules stromales¹⁴⁴.

La capacité des CSMs à se différencier en cellules épithéliales et stromales cornéennes permet d'envisager une substitution aux greffes de CSLs afin de régénérer le tissu cornéen. Ces résultats ont également conduit à étudier l'aptitude des CSMs à favoriser la réparation de l'endothélium cornéen. Cet objectif constitue un enjeu majeur car les cellules endothéliales qui maintiennent la transparence de la cornée ne présentent aucune capacité de renouvellement. Par criblage du génome des CSMs et des cellules endothéliales cornéennes, certaines similitudes phénotypiques ont été mises en évidence. De plus, la culture des CSMs en présence de milieu conditionné de cellules épithéliales du cristallin montre un rapprochement phénotypique plus prononcé entre les deux types cellulaires¹⁴⁵.

III.3.2 Atteintes cornéennes superficielles et profondes

En 2006, *Ma Y et al.* utilisent des membranes amniotiques sur lesquelles ils cultivent des CSMs, qu'ils suturent sur la cornée chimiquement brûlée à 100%, afin de la reconstruire. Ils observent des effets bénéfiques similaires à ceux observés avec les CSLs et posent la question de savoir si ces effets proviennent uniquement de la couverture de la plaie ou d'un potentiel effet paracrine des CSMs sur l'inflammation et l'angiogenèse¹⁴⁶. Des travaux ont montré l'efficacité des CSMs et de leur milieu conditionné (MC-CSM) à inhiber l'angiogenèse et l'inflammation ? favorisant ainsi la ré-épithélialisation et la transparençisation de la cornée dans des modèles d'atteintes cornéennes chimiques^{139,147-150}. Les CSMs produisent et libèrent des facteurs anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β and IL-6) qui leur confèrent des propriétés immunomodulatrices importantes. Ces effets sont majeurs sur la prolifération et sur la maturation des cellules de l'immunité innée et adaptative¹⁵¹. En outre, les CSMs semblent s'activer en réponse à des signaux provenant du tissu cornéen lésé induisant l'expression d'une protéine anti-inflammatoire, *TNF- α -stimulated gene/protein 6* (TSG-6)^{148,149}. TSG-6 semble présenter un rôle majeur dans l'activité anti-inflammatoire cornéenne des CSMs. En effet, deux études ont montré que l'effet anti-inflammatoire était conservé lors de l'injection de TSG-6 recombinant 2h après l'atteinte cornéenne¹⁴⁸ et était largement inhibé lorsque les CSMs injectées étaient transfectées par des siRNA contre TSG-6¹⁴⁹. Dans la même étude, *Roddy et al.* ont confirmé l'efficacité de la thérapie cellulaire en injectant des CSMs par voie systémique, à distance du site de lésion dans un modèle d'atteinte chimique de la cornée chez le rat¹⁴⁹. En effet, les CSMs expriment de nombreux récepteurs aux chimiokines leur permettant d'être recrutées au niveau des sites inflammatoires.

De manière surprenante, l'effet proangiogénique des CSMs à l'origine de leur intérêt dans les pathologies ischémiques cardiaques, rénales ou encore nerveuses, n'est pas observé dans la cornée¹⁵²⁻¹⁵⁴. Au contraire, les CSMs présentent un effet protecteur vis-à-vis de la néovascularisation restaurant ainsi le privilège anti-angiogénique de la cornée. Oh JY et al. expliquent ces effets par l'induction, par les CSMs transplantées, de l'augmentation d'expression de la thrombospondine-1 (TSP-1) qui est un facteur fortement anti-angiogénique et parallèlement par la diminution d'expression de la métalloprotéinase-2 (MMP-2) et du VEGF qui sont des facteurs fortement proangiogéniques¹⁴⁷.

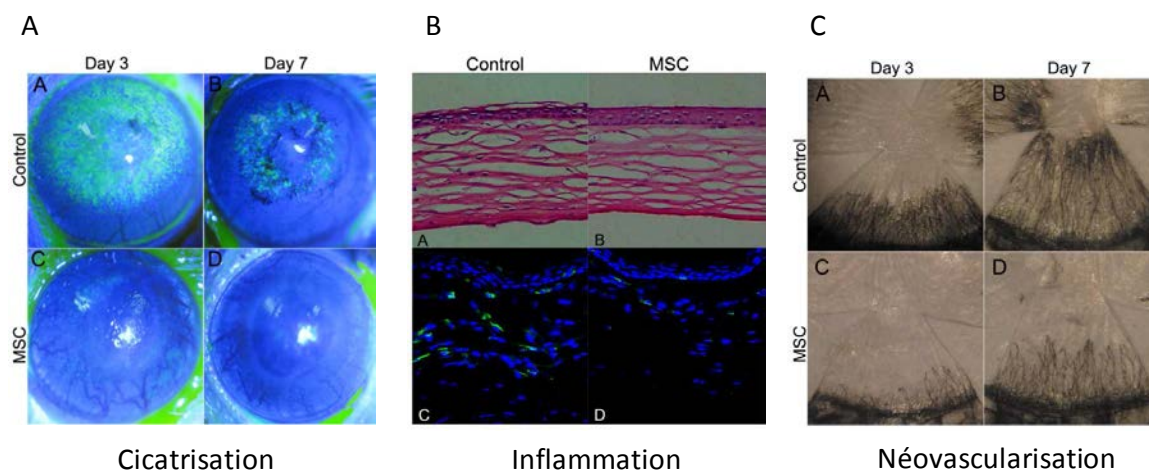


Figure 22: Effet des CSMs dans un modèle de brûlure chimique de la cornée chez le rat sur la cicatrisation (A), l'inflammation (B) et la néovascularisation (C)¹⁵⁰.

III.3.3 Greffe cornéenne

L'un des domaines dans lequel l'utilisation des CSMs est le plus développé est dans la prévention de la GvHD. Le pouvoir immunorégulateur des CSMs a aujourd'hui largement été décrit dans différents contextes physiopathologiques, dans divers modèles *in vitro* et *in vivo* ainsi que chez différentes espèces. Les CSMs ont la capacité d'interagir avec le système immunitaire inné et adaptatif en agissant sur différents types cellulaires tels que les lymphocytes B et T ainsi que les cellules NK ou encore les CD. Cependant, un environnement inflammatoire, notamment lors de la stimulation par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et le TNF- α , semble nécessaire afin que les CSMs puissent présenter une activité immunosuppressive^{81,86,151}.

Ces effets semblent contrôlés par les facteurs solubles que les CSMs sécrètent agissant directement sur le profil d'expression en cytokines des cellules immunitaires^{78,151}. En outre, la transplantation de CSMs est très peu immunogène au vu du faible taux d'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I et II et des molécules costimulatrices (CD40, CD80 et CD86) qu'elles expriment. Les effets immunomodulateurs et la faible immunogénicité des CSMs permettent leur utilisation afin d'optimiser la tolérance des transplantations allogénique et même xénogénique. Les greffes de cornée présentent le taux de réussite le plus important parmi les transplantations allogéniques d'organes solides. Cette proportion de réussite à long terme est liée au privilège immunitaire qui caractérise la cornée¹⁵⁵. Bien que le taux de réussite soit plus important, la cause majeure d'échec reste le

rejet du greffon. Jia et al. ont montré un effet bénéfique de la greffe de CSMs dans la prévention du rejet de greffe chez le rat. La transplantation de CSMs améliore les effets de la ciclosporine, permettant une augmentation du temps moyen de survie du greffon¹⁵⁶. Les effets semblent importants car manifestés en injection systémique et prédominent dans la phase aiguë inflammatoire consécutive à la greffe de cornée avec une action majeure sur l'inhibition de l'activation des cellules dendritiques¹⁵⁷. Le TSG-6 synthétisé et libéré par les CSMs semble être un acteur majeur dans la survie des greffons cornéens¹⁵⁷.

L'utilisation des CSMs dans la prévention du rejet de greffe présente donc un intérêt majeur. Son développement sera d'autant plus important que les mécanismes immunomodulateurs précis des CSMs seront mieux compris et donc mieux maîtrisés¹⁵¹.

III.3.4 Sécheresse oculaire

Au vu des effets anti-inflammatoires importants de la greffe de CSMs dans des modèles inflammatoires aigus, de récentes études ont porté sur l'intérêt des CSMs dans la sécheresse oculaire (SO). La sécheresse oculaire est une pathologie de la surface oculaire pouvant affecter la cornée et s'accompagnant d'une inflammation chronique. La perturbation multifactorielle du film lacrymal qui protège la surface oculaire provoque un stress sur les épithéliums cornéen et/ou conjonctival¹⁵⁸. Les épithéliums de la surface oculaire ne constituent pas une simple barrière mais ont un rôle dans l'initiation de cette inflammation par synthèse de nombreuses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires ainsi que par leurs récepteurs activant ainsi les cellules inflammatoires résidentes. Il existe déjà des traitements « curatifs » tels que les anti-inflammatoires et immunosuppresseurs comme la ciclosporine, ainsi que les sérums autologues visant à favoriser la réparation tissulaire par apport de facteurs de croissance notamment (EGF, NGF).

De récentes études ont montré l'effet des CSMs dans des modèles *in vitro*¹⁵⁹ et *in vivo*^{160,161} de SO afin d'évaluer l'impact à la fois sur la réparation cornéenne et sur l'inflammation. La stimulation de cellules humaines cornéennes par des cytokines proinflammatoires TNF- α et IFN- γ en culture avec du sécrétome ou en coculture avec des CSMs montre une diminution de l'expression de marqueurs inflammatoires tels que les HLA ou des molécules d'adhésion intercellulaires comme *intracellular adhesion molecule* (ICAM-1)¹⁵⁹. Deux études *in vivo* ont montré l'efficacité des CSMs à réduire l'inflammation dans des modèles de SO. L'une dans

un modèle aigu de SO inflammatoire induite par l'instillation de chlorure de benzalkonium 0,2% pendant 7 jours¹⁶⁰. L'instillation de collyre à base d'une suspension cellulaire de CSMs diminue les paramètres cliniques de SO (volume des larmes, intégrité de la surface oculaire) et semble diminuer l'infiltration de cellules inflammatoires. Cet effet anti-inflammatoire des CSMs est confirmé dans un autre modèle de SO par injection intraorbitaire de concanavaline A où l'on observe une diminution de l'infiltration de lymphocytes CD4¹⁶¹.

Les patients atteints de SO se sentent souvent en échec thérapeutique malgré l'existence de différentes options de prise en charge probablement par une mauvaise compréhension des mécanismes physiopathologiques de la SO. Même si la thérapie cellulaire autologue pour traiter la sécheresse oculaire semble difficile, le pouvoir immunorégulateur et la faible immunogénicité des CSMs (cf. : CSMs et greffe cornéenne) permettent d'envisager la mise en place de transplantation allogénique (NCT00953485, <http://clinicaltrials.gov/>). De plus, les cas plus sévères de SO et les syndromes auto-immuns de Gougerot-Sjögren ayant un impact important sur la qualité de vie des patients et engendrant de réels troubles de la vision allant jusqu'à la cécité pourraient probablement justifier la collection de CSMs autologues.

III.4 CSMs et uvéites

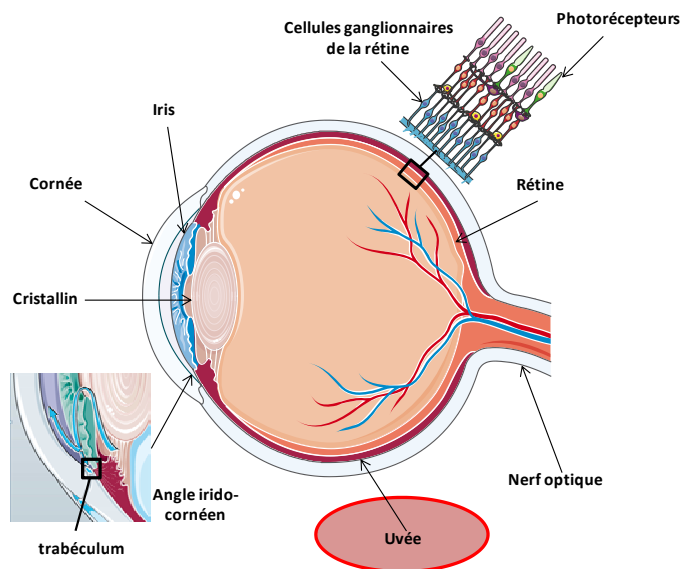


Figure 23 : Tissu atteint au cours des uvéites

L'uvéite est une inflammation de l'uvée, structure qui comprend l'iris, le corps ciliaire et la choroïde. Quelque soit la zone touchée, antérieure, intermédiaire ou postérieure, elle associe une inflammation intraoculaire et une altération de l'acuité visuelle. Les origines de la pathologie sont multiples et les traitements sont adaptés en fonction de l'étiologie. Les traitements sont souvent efficaces pour les causes infectieuses et associent des antibiotiques et des anti-inflammatoires. Cependant, dans environ 50% des cas, une origine immune ou auto-immune est suspectée¹⁶². Les corticostéroïdes et les immunosuppresseurs sont souvent utilisés en première intention avec toutes les complications liées à l'usage à long terme de ces traitements. Bien que les agents biologiques inhibant spécifiquement certaines molécules pro-inflammatoires telles que le TNF ou encore l'IL-1, soient efficaces et présentent moins d'effets secondaires, ils ne permettent pas de répondre à l'hétérogénéité des désordres inflammatoires des patients atteints d'uvéite¹⁶³. Le recul que l'on a sur l'efficacité des CSMs dans le traitement des pathologies auto-immunes comme le lupus érythémateux¹⁶⁴, la maladie de Crohn¹⁶⁵, la polyarthrite rhumatoïde¹⁶⁶ ou encore le syndrome de Gougerot-Sjögren⁹¹ en font un candidat intéressant pour le traitement des uvéites auto-immunes.

Pour différentes pathologies auto-immunes, les CSMs ont témoigné d'effets bénéfiques sur la balance entre les lymphocytes T helper 1 et 17 (Th1 et Th17) et les lymphocytes T régulateurs (Treg) à la fois dans des modèles précliniques mais également dans des études cliniques^{164,165}. Des modèles expérimentaux d'uvéite auto-immune (EUA) du segment postérieur de l'œil par immunisation utilisant un adressage avec une protéine liant le rétinol entre les photorécepteurs (IRBP) ont été utilisés pour étudier l'effet des CSMs. Les modèles EUA ont l'avantage de présenter des atteintes rétiniennes proches de celles observées chez l'homme. Ces modèles présentent une altération tissulaire au travers d'une réaction inflammatoire plus ou moins rapide avec une infiltration macrophagique générale du tissu et le recrutement de lymphocytes Th1 et Th17^{167,168}. L'injection intraveineuse^{169,170} ou intrapéritonéale^{171,172} de CSMs dans des modèles EUA induit une augmentation du pourcentage de lymphocytes Treg et des cytokines qu'ils libèrent telles que l'IL-10 ou encore le TGF- β et parallèlement une diminution de l'infiltration des lymphocytes Th1 et Th17 accompagnée d'une diminution des cytokines pro-inflammatoires IL-17 et IFN- γ ^{169,170,172}. Cette modification de la balance Th1-17/Treg semble favoriser le maintien de l'intégrité de la rétine¹⁷¹.

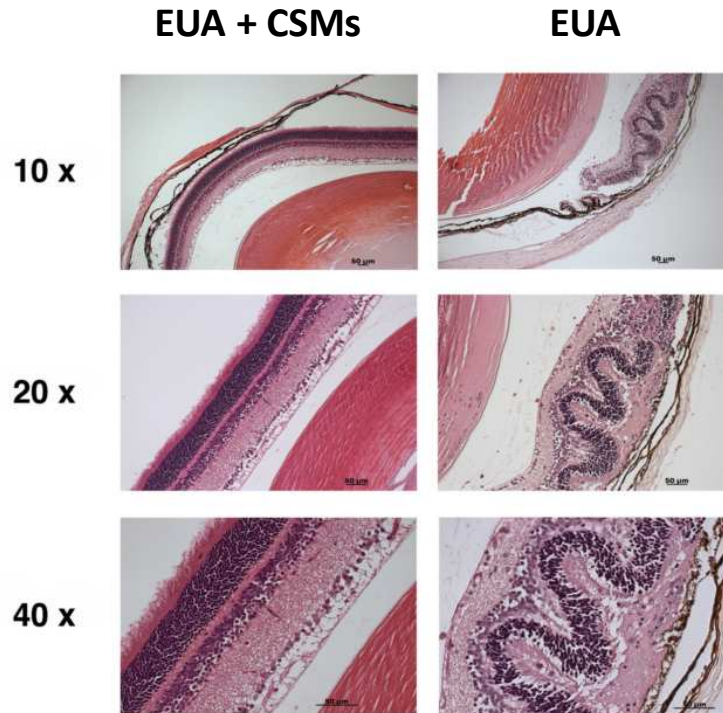


Figure 24: Maintien de l'intégrité tissulaire de la rétine induite par la greffe de CSMs dans un modèle expérimental d'uvéite autoimmune¹⁷¹.

L'ensemble de ces résultats est prometteur quant à l'utilisation des CSMs dans les uvéites auto-immunes. Cependant, de nouvelles études précliniques sont requises avec l'utilisation d'autres modèles expérimentaux afin notamment de mieux comprendre les mécanismes spécifiques des CSMs dans les désordres d'ordre immunologique. En effet, les CSMs ne sont pas intrinsèquement efficaces contre les désordres auto-immuns. Elles ont des effets variables en fonction de nombreux paramètres se rapportant à leur utilisation (préventif/curatif, quantité de cellules injectées, moment de l'injection, origine des CSMs) et au contexte physiopathologique (niveau inflammatoire, phase aiguë/chronique). Certains travaux ont publié un défaut d'efficacité des CSMs pour inhiber la réaction immunitaire dans des modèles expérimentaux de névrite autoimmune¹⁷³. Les premiers essais cliniques devraient bientôt commencer à la vue des nombreuses données précliniques déjà accumulées.

Conclusion

L'œil est un organe particulièrement bien adapté à l'application de thérapies innovantes comme la thérapie cellulaire. L'accessibilité des sites d'injection, la maîtrise de la dissémination des cellules injectées grâce à la barrière hémato-rétinienne, et le suivi aisé des effets de l'injection en sont les raisons majeures. L'utilisation des cellules souches mésenchymateuses ne requiert aucune modification génétique et les propriétés immunomodulatrices importantes de ces cellules font que cette thérapie cellulaire peut être réalisée aussi bien de manière autologue qu'hétérologue. L'injection de CSMs semble particulièrement efficace et adaptée à certaines pathologies ophtalmiques : le glaucome, l'uvéïte ou encore la prévention du rejet de greffe cornéenne car ces pathologies font appel à des propriétés déjà bien connues des CSMs. L'accumulation rapide de résultats précliniques pour ces pathologies conduit logiquement à la mise en place d'essais cliniques. Cependant la transposition à l'homme doit prendre en compte la variabilité des contextes physiopathologiques entre modèles expérimentaux, comme le niveau inflammatoire par exemple ou la variabilité des réponses selon les espèces^{151,174}. Au-delà de l'application de la thérapie cellulaire proprement dite, les CSMs constituent également un outil expérimental intéressant pour une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques et pour l'identification de nouvelles molécules ou cibles thérapeutiques par l'analyse des multiples molécules qu'elles synthétisent et sécrètent et qui constituent leur sécrétome.

IV. Méthodes d'optimisation de la thérapie cellulaire avec les CSMs

Les CSMs constituent un outil thérapeutique puissant avec un profil de sécurité intéressant. Cependant dans un objectif de transposition à l'homme, il est toujours important d'essayer d'augmenter au maximum la balance bénéfice/risque. Pour cela, l'optimisation des effets bénéfiques des CSMs, en diminuant la quantité de cellules à injecter tout en obtenant un même effet thérapeutique, est un enjeu essentiel. Plusieurs paramètres ont donc été identifiés comme pouvant favoriser la survie, l'incorporation au tissu et l'activité paracrine des CSMs post-injection.

IV.1 Paramètres généraux de thérapie cellulaire

IV.1.1 Quantité de cellules à injecter

La quantité de cellules injectées est un paramètre important qui impacte directement l'efficacité de la thérapie cellulaire. Des études cliniques ont déjà montré une différence de réponse clinique en fonction de la quantité de cellules injectées¹⁷⁵. En médecine régénérative et notamment dans les pathologies de type ischémique, la taille de la zone nécrosée est un paramètre à prendre en compte afin d'adapter la quantité de cellules nécessaire. Certains compartiments d'injection comme la chambre antérieure de l'œil par exemple posent un problème de volume d'injection. Il est essentiel de respecter un rapport quantité de cellules/volume d'injection permettant une bonne dispersion des cellules et ainsi d'éviter les agrégats cellulaires. Bien que l'extrapolation entre un rongeur et un être humain soit compliquée, avant toute transposition à l'homme, il est nécessaire de réaliser des études précliniques de dose-réponse afin d'adapter la quantité de cellules à injecter en fonction de l'effet thérapeutique escompté.

IV.1.2 Voies d'administration des cellules

La voie d'administration des CSMs est un paramètre majeur qui conditionne la biodisponibilité des cellules et les études de pharmacocinétique. Les CSMs sont souvent utilisées dans des processus dégénératifs d'origine ischémique, inflammatoire ou autre.

L'injection directe des CSMs dans un environnement tissulaire « hostile » ne favorise pas le pourcentage déjà faible de survie des cellules. En plus de diminuer les stress mécaniques, l'injection systémique présente l'avantage d'injecter les CSMs à distance des sites lésionnels. Cependant, l'ensemble des CSMs ne vont pas être recrutées au niveau de la zone d'intérêt. Suzuki et al. estiment à 2% le pourcentage des CSMs injectées en intracoronaire qui se sont incorporées au tissu cardiaque ciblé deux semaines après l'injection. L'injection systémique nécessite donc d'injecter une plus grande quantité de cellules afin d'obtenir le même effet thérapeutique et pose la question du devenir et de la dissémination des CSMs dans l'organisme.

IV.2 Paramètres spécifiques des CSMs

IV.2.1 Optimisation de l'effet immunomodulateur

Comme vu précédemment, les CSMs sont beaucoup utilisées pour leurs interactions avec le système immunitaire. En fonction de l'environnement inflammatoire, les CSMs acquièrent un profil pro- ou anti-inflammatoire⁸³. En parallèle de cette avancée dans la compréhension des mécanismes immunomodulateurs des CSMs (cf I.B.3), des facteurs particuliers ont été identifiés comme ayant un impact majeur dans l'immunorégulation induite par les CSMs. Des protocoles de conditionnement des CSMs ont été mis en place afin de conférer aux cellules un phénotype particulier, notamment en stimulant la production de facteurs anti-inflammatoires tels que IDO et TSG-6 (Figure 20).

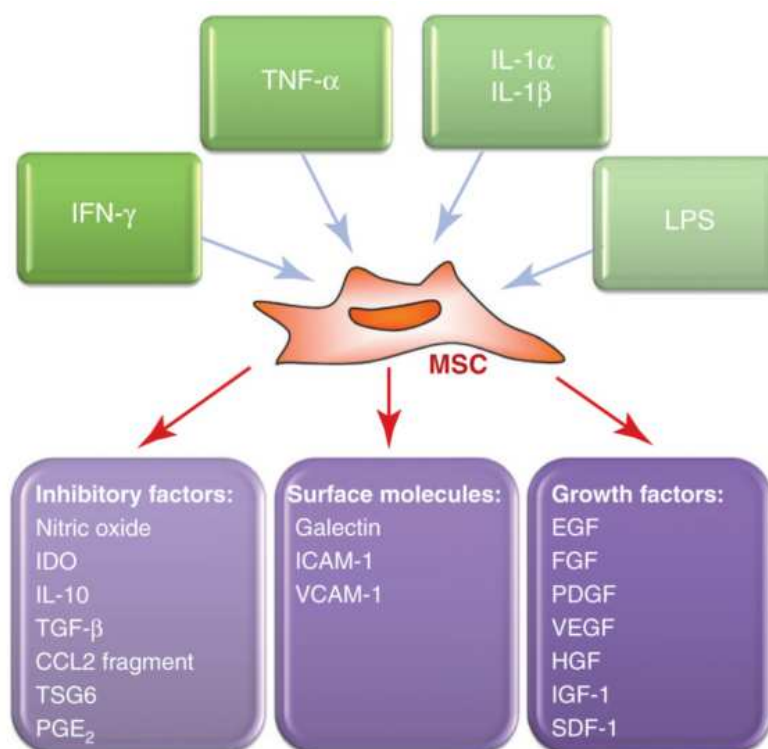


Figure 25: Effet du preconditionnement des CSMs par des cytokines et du LPS sur leur production de facteurs trophiques et anti-inflammatoires⁵¹.

Le premier protocole de stimulation des CSMs consiste à activer les récepteurs TLR3 à la surface des cellules avant injection. En effet, des études ont montré que l'activation du récepteur TLR3 par de l'ADN double brin synthétique mimant l'ADN viral par exemple¹⁷⁶, induisait une augmentation de l'expression par les CSMs de facteurs anti-inflammatoires (IL-10, IL-11, LIF) et trophiques (VEGF, CXCL12, HGF) sans augmenter pour autant l'expression de facteurs pro-inflammatoires¹⁷⁷.

De plus, il a été montré que le prétraitement des CSMs par des cytokines pro-inflammatoires telles que : l'IFN- γ , le TNF- α ou encore l'IL-1 favorisait la production de plusieurs facteurs de croissance et anti-inflammatoire tels que IDO (Figure 20) par les cellules^{81,174}. Krampera et al. dans le cadre de l'ISCT postulent alors que l'IFN- γ , indépendamment de l'espèce concernée, est le facteur le plus puissant pour induire les fonctions immunomodulatrices des CSMs. Plus précisément, la stimulation des CSMs par l'association de l'IFN- γ et du TNF- α semble être un cocktail efficace pour optimiser l'effet immunorégulateur des CSMs²⁴.

IV.2.2 Optimisation de la survie

Un problème majeur rencontré en thérapie cellulaire est la mort rapide et massive des cellules dans les heures qui suivent l'injection. Ceci est la conséquence, entre autres, d'un stress mécanique que subissent les cellules au cours du passage dans la seringue et du contraste pressionnel auquel elles sont confrontées. La survie des cellules suite à l'injection est un facteur limitant la réussite des protocoles de thérapie cellulaire. Plusieurs méthodologies sont alors étudiées pour augmenter la survie des CSMs.

IV.2.2.1 Traitement hypoxique

Un autre facteur majeur responsable de la mort rapide des CSMs à la suite de leur injection est le stress oxydant qui provoque la mise en place de mécanismes d'apoptose. Physiologiquement, les cellules sont dans un environnement composé de 1 à 7% d'oxygène alors qu'en culture elles sont maintenues classiquement dans un environnement composé de 20% d'oxygène. Il faut donc préconditionner les CSMs dans un environnement hypoxique. L'exposition des cellules avant injection à un environnement hypoxique diminue ainsi le stress subi par les cellules au moment de l'injection. De plus, il a été montré que les CSMs exposées à un environnement hypoxique expriment plus fortement la chimiokine CXCL12 et son récepteur CXCR4¹⁷⁸. Feng et al. ont démontré que la chimiokine CXCL12 est indispensable aux effets bénéfiques des CSMs dans un modèle d'infarctus du myocarde. Elle participerait activement au recrutement des cellules souches/progéniteurs endogènes permettant la reconstruction du tissu nécrosé⁷⁵. Le récepteur CXCR4 permet la migration et le recrutement des CSMs au niveau du site lésionnel, qu'elles soient d'origine endogène ou exogène¹⁷⁹.

IV.2.2.2 Prétraitement à la mélatonine

Mias et al. ont montré que le prétraitement des CSMs à la mélatonine augmente l'efficacité de la greffe dans un modèle d'ischémie rénale. Par des approches *in vitro*, ils ont pu montrer que la mélatonine induit une augmentation de l'expression d'enzymes antioxydantes ainsi que de facteurs de croissance tels que le bFGF et le HGF par les CSMs. Enfin, le milieu conditionné des cellules stimulées à la mélatonine favorise la formation de tubes par les cellules endothéliales *in vitro*. Cette étude conclut en disant que la mélatonine promeut la survie, l'activité paracrine et l'efficacité des CSMs. L'effet bénéfique du prétraitement des CSMs à la

mélatonine a ensuite été confirmé par de nombreuses études dans différents modèles pathologiques^{180,181}.

IV.2.3 Modification génétique

La modification génétique des CSMs est une stratégie efficace pour augmenter les effets de leur greffe. Elle a été utilisée afin d'augmenter la survie, les capacités de différenciation et l'activité paracrine des CSMs. La combinaison de la thérapie génique et de la thérapie cellulaire semble être un outil très efficace pour potentialiser les effets des CSMs.

Dans un premier temps la stratégie a été de transfecter les CSMs pour diminuer leur mort post-greffe. Certains travaux ont ainsi montré que la surexpression du gène antiapoptotique Akt limite bien l'apoptose des cellules *in vitro* et améliore les effets bénéfiques des CSMs *in vivo*¹⁸². La transfection de gènes codant pour des enzymes antioxydantes telle que l'hème oxygénase-1 (HO-1), a également été investiguée. Les cellules transfectées semblent survivre davantage à l'injection intraparenchymateuse et présentent un potentiel protecteur augmenté en diminuant notamment l'apoptose des cellules spécialisées du tissu cible¹⁸³.

Une autre stratégie consiste à faire surexprimer des facteurs identifiés comme ayant un rôle prépondérant sur les effets bénéfiques des CSMs. Des gènes codant pour différents facteurs de croissance ou chimiokines/récepteurs ont été surexprimés par transfection avant l'injection des cellules. Cette approche permet à la fois d'optimiser les effets de la greffe des CSMs mais également de valider l'importance d'une molécule candidate du sécrétome des cellules, supposée jouer un rôle majeur dans les effets favorables observés. Harper et al., dans un modèle d'hypertension oculaire par photocoagulation du trabéculum, ont investigué l'effet neuroprotecteur des CSMs en injection intravitréenne. Ils observent que les CSMs préservent les cellules ganglionnaires de la rétine mais que les cellules modifiées surexprimant le BDNF sont plus efficaces. Ils concluent que les CSMs-BDNF constituent un outil intéressant pour la neuroprotection des RGC dans un modèle de glaucome et que le BDNF constitue une molécule candidate intéressante¹⁸⁴.

L'ensemble de ces études montrent que la modification génétique des CSMs pour optimiser leurs effets est une approche efficace. Cependant, tout comme la thérapie génique, cette stratégie pose la question du risque et du devenir dans l'organisme de cellules génétiquement modifiées, et donc du transfert de cette thérapeutique à l'homme alors que l'un des avantages

majeurs de la thérapie cellulaire utilisant les cellules souches mésenchymateuses est leur profil de sécurité. Toutefois, il existe des alternatives permettant de maîtriser la dissémination des CSMs dans l'organisme, notamment par encapsulation des cellules.

IV.2.4 Biomatrices

Les approches d'ingénierie tissulaire offrent la possibilité d'utiliser des biomatériaux permettant à la fois de servir de support mécanique à de la greffe mais aussi d'améliorer la survie, la différenciation et l'activité globale des cellules souches^{153,154}. De manière générale en thérapie cellulaire, le devenir des cellules injectées dans l'organisme est une question récurrente à laquelle il est parfois difficile de répondre. La plupart des stratégies d'ingénierie tissulaire repose sur une transplantation des cellules, soit sur des supports optimisant leur colonisation et leur différenciation dans le cadre de réparation osseuse par exemple (Figure 21), soit sur leur encapsulation afin de maîtriser leur dissémination *in vivo* (Figure 22).

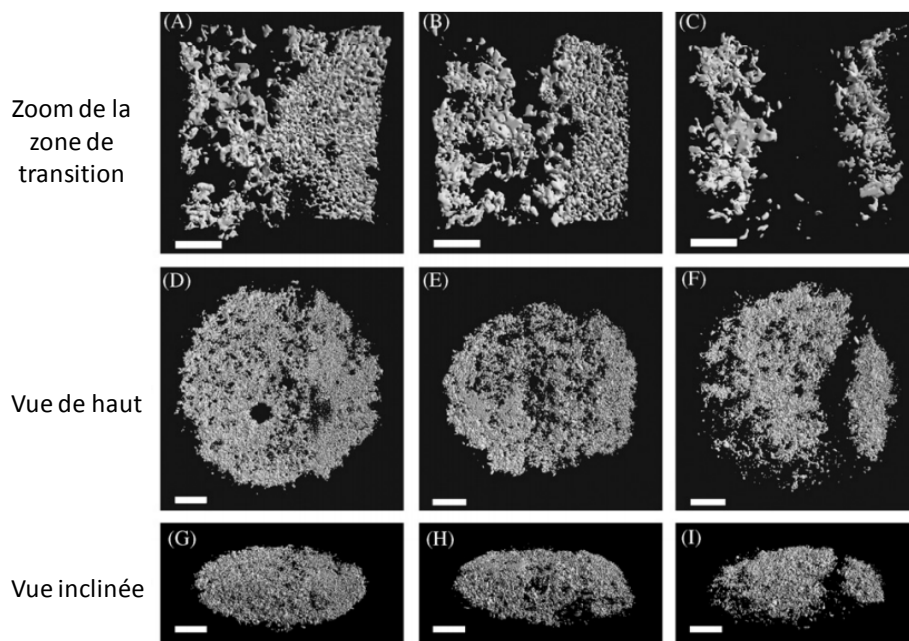


Figure 26: Représentation de tissu osseux artificiel et des pores formés sous 3 plans de vue différents¹⁸⁵

Le choix du support va conditionner le comportement des CSMs qui y seront greffées. De nombreux paramètres doivent être étudiés comme la taille, la forme et la distribution des pores, mais également la forme et la rugosité de la structure.

L'encapsulation est adaptée aux CSMs dans les domaines qui font majoritairement appel à leur activité paracrine. Les systèmes d'encapsulation développés permettent la diffusion des molécules sécrétées par les CSMs tout en maintenant les cellules encapsulées (Figure 22). Certaines biomatrices pour microencapsulation des cellules favorisent leur survie et ainsi leurs effets après injection^{186,187}. Cette approche permet également d'utiliser des cellules génétiquement modifiées pour leur faire surexprimer des facteurs d'intérêt tout en maîtrisant leur dispersion chez l'hôte.

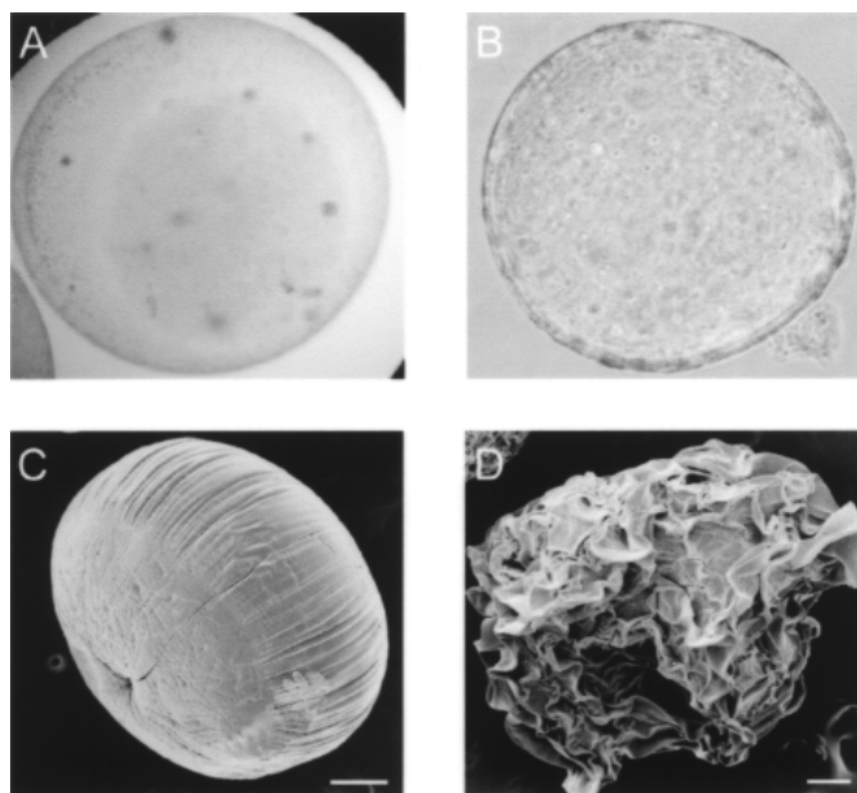


Figure 27: Image en microscopie confocale de microsphère et de microcapsule servant à l'encapsulation des CSMs¹⁸⁸.

Il existe des biomatrices de natures différentes comme les patches de fibrine sur lesquels les CSMs sont déposées¹⁸⁹, les microsphères de collagène ou d'agarose¹⁸⁶ ou encore les matrices directement injectables qui forment des gels solides à des températures physiologiques¹⁸⁷.

Les biomatrices sont un outil prometteur pour augmenter la survie des cellules greffées en atténuant les stress mécaniques et oxydatifs liés à l'injection intraparenchymateuse des CSMs.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

But de la thèse

Le but de cette thèse a été de mettre au point l'isolement et la caractérisation des CSMs au sein du laboratoire afin de tester l'efficacité de cette thérapie cellulaire dans un modèle de glaucome chez le rat. Plus précisément nous voulions déterminer si les CSMs pouvaient présenter un intérêt thérapeutique dans la prévention de la dégénérescence du trabéculum qui est le filtre dynamique régulant la pression intraoculaire. A la suite des résultats obtenus *in vivo*, nous avons souhaité déterminer par quels mécanismes les CSMs peuvent protéger à la fois la fonction trabéculaire et les cellules ganglionnaires de la rétine de la mort induite par le modèle. Ce travail fait l'objet du « Projet 1 ».

En outre, nous avons mis au point deux modèles inflammatoires d'atteintes oculaires :

Un premier concerne la neuroinflammation de la rétine et des voies centrales de la vision dans le même modèle de glaucome. Ce travail devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes responsables de la dégénérescence des tissus nerveux à l'origine de l'altération du champ visuel chez les patients glaucomateux. Un résumé de ce projet et de ses premiers résultats est présenté dans la partie « Projet 2 ».

Un second concerne une autre pathologie inflammatoire, la sécheresse oculaire par une approche *in vitro*. La sécheresse oculaire est une pathologie affectant la surface oculaire et dans laquelle une inflammation chronique joue un rôle central. Après le film lacrymal, les épithéliums cornéen et conjonctival sont les premiers tissus exposés aux agressions environnementales et constituent en cela une barrière défensive de l'œil mais ils sont également à l'origine de l'installation de cette inflammation chronique par les médiateurs inflammatoires qu'ils peuvent sécréter. Un résumé des travaux réalisés sur ce projet sont présentés dans la partie « Projet 3 ».

Dans ces deux modèles, les propriétés anti-inflammatoires des CSMs et de leur sécrétome sont actuellement en cours d'études..

PROJET 1

(Article en révision dans le journal Stem Cells)

<p>PROTECTION NEURONALE ET DIMINUTION DE LA PRESSION INTRA- OCULAIRE INDUITE PAR LES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES ISSUES DE LA MOELLE OSSEUSE DANS UN MODÈLE DE GLAUCOME CHEZ LE RAT</p>
--

Roubeix C, Godefroy D, Mias C, Sapienza A; Riancho L, Degardin J, Fradot V, Ivkovic I, Picaud S, Sennlaub F, Rostene W, Sahel JA, Melik Parsadaniantz S, Brignole-Baudouin F, Baudouin C

INTRODUCTION

Le glaucome primitif à angle ouvert (GPAO) combine une dégénérescence du trabéculum, responsable d'une augmentation de la pression intraoculaire (PIO), et des cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs). La majorité des traitements cible la baisse de la PIO par des traitements pharmacologiques ou chirurgicaux. Cependant, aucun traitement ne vise à protéger directement le trabéculum afin de restaurer/préserver sa fonction.

Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) de la moelle osseuse sont aujourd'hui utilisées pour traiter de nombreuses pathologies dégénératives. Elles sont décrites comme participant physiologiquement au maintien de l'homéostasie tissulaire. Elles ont été isolées à partir de nombreux organes, et notamment du trabéculum²⁷. Des études ont déjà montré que les CSMs étaient capables de protéger les CGRs dans différents modèles de glaucome^{135,184,190,191}. Pour la première fois, Manuguerra et al. ont montré que les CSMs étaient capables de régénérer le trabéculum dans un modèle de glaucome par destruction du trabéculum au laser⁷⁴.

Dans ce travail nous confirmons l'effet de l'injection intracamérale des CSMs sur la baisse de la PIO dans un autre modèle d'hypertension oculaire induit par cautérisation des veines épisclérales (Figure article 2). Les CSMs marquées avec des nanocristaux fluorescents sont retrouvées, 23 jours après l'injection, incorporées autour de l'angle irido-cornéen, au niveau de l'iris, de l'endothélium cornéen, du trabéculum et des procès ciliaires (Figure article 3). L'analyse de la densité des CGRs montre un effet protecteur de la greffe des CSMs sur la mort des CGRs périphériques induite par le modèle (Figure article 4). Par une approche *in vitro*, nous avons caractérisé les effets protecteurs du milieu conditionné des CSMs sur des cellules primaires trabéculaires en termes de viabilité, contractibilité et préservation phénotypique (Figure article 5, 6). De plus, nous avons montré que le milieu conditionné des CSMs présente un effet protecteur direct sur une culture primaire purifiée de CGRs en favorisant leur survie et leur croissance (Figure article 7).

Finalement, nous montrons pour la première fois que l'injection intracamérale des CSMs a des effets bénéfiques à la fois sur la chambre antérieure et postérieure de l'oeil. Les CSMs permettent de préserver l'intégrité du trabéculum par la baisse de la PIO et ainsi de protéger les CGRs de la mort induite par l'hypertension oculaire.

<p style="text-align: center;">NEUROPROTECTION AND INTRAOCULAR PRESSURE REDUCTION CONFERRED BY BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS IN AN ANIMAL MODEL OF GLAUCOMA</p>

ABSTRACT

Glaucoma is a sight-threatening retinal neuropathy associated with elevated intraocular pressure (IOP) due to degeneration and fibrosis of the trabecular meshwork (TM). Glaucoma medications aim to reduce IOP without targeting the specific TM pathology, which could explain treatment failure observed in some cases. Bone-marrow mesenchymal stem cells (MSCs) are used today in various clinical studies to treat various degenerative processes. Here, we investigated the potential of MSC therapy in an ocular hypertension model. We demonstrated a rapid and long-lasting *in vivo* effect of MSC transplantation that significantly reduced IOP in hypertensive eyes induced by episcleral vein cauterization (EVC). MSCs were found located to the ciliary processes and the TM and are able to survive at these places. Enumeration of retinal ganglion cells (RGCs) on whole flat-mounted retina highlighted a protective effect of MSCs on RGC death. *In vitro*, the effect of MSC-conditioned medium (MSC-CM) on both the primary human trabecular meshwork (hTM) and RGCs showed that MSC-CM promotes: (i) hTM survival by activating the antiapoptotic pathway, Akt, (ii) hTM decontractibility as analyzed by the decrease in myosin phosphorylation and (iii) inhibition of TGF- β_2 -dependent profibrotic phenotype acquisition in hTM, (iiii) RGC survival and neuritic outgrowth *in vitro*. Finally, MSCs injection in the ocular anterior chamber in a rat model of ocular hypertension provides a neuroprotective effect in the glaucoma pathophysiology directly on RGC and indirectly via TM protection. These results originally demonstrate that MSCs represent promising tool for treating ocular hypertension and retinal cell degeneration.

INTRODUCTION

Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult pluripotent stem cells that today have become an attractive new tool to treat various degenerative diseases. MSCs exist in almost all organs and tissues²¹, have been characterized by the expression of surface markers such as CD73, CD90, CD29 and CD105¹⁹, and their ability to differentiate *in vitro* into several cell types (i.e., osteoblasts, adipocytes, chondroblasts and neuronal cells)¹⁹. The efficacy of MSC therapy was originally attributed to their capacity to restore a population of differentiated cells through transdifferentiation¹⁹². However, MSCs also secrete a broad range of bioactive factors that constitute their sécrétome, which is responsible for the trophic (angiogenic, anti-apoptotic and organ-intrinsic precursor or stem cell proliferation), immunomodulatory, anti-scarring and chemoattractant effects of MSCs^{112,113}. In neurodegenerative diseases, it has been demonstrated that MSCs secrete neurotrophic factors (such as BDNF, NGF or VEGF), directly promoting neural cell survival and cell growth or acting on the microenvironment of the neural tissue¹¹⁴. Recently, several preclinical studies using neurological disease models confirmed the high value of MSCs as sources of neurons as well as sources of factors able to protect and promote tissue regeneration^{193–195}. In fact, cell-based therapies, such as gene-based therapies, offer powerful therapeutic tools, but their transfer to the clinical context remains difficult at times depending on the disease and the tissue involved. These new therapeutic means have found a convenient organ with the eye because it is directly accessible to therapeutic interventions, protected from the systemic circulation and easy to examine so that drug efficacy and side effects can be monitored⁹⁷.

Glaucoma is a neurodegenerative disease affecting approximately 70 million people and is the second leading cause of irreversible blindness worldwide. In contrast to other degenerative eye diseases, glaucoma may appear early in life, and consequently requires long-term ophthalmic medication. Primary open-angle glaucoma (POAG) combines trabecular meshwork (TM) degeneration leading to chronic ocular hypertension and optic neuropathy through retinal ganglion cell (RGC) degeneration. High intraocular pressure (IOP) is the main risk factor contributing to the progressive loss of RGCs. Current therapies for POAG aim to lower IOP by medication or surgery. However, these treatments do not specifically target the pathologic mechanisms involved in TM degeneration. Indeed, TM degeneration in glaucoma is associated with the loss of TM cells, mainly through apoptotic mechanisms and oxidative stress, as well as extracellular matrix remodeling and accumulation^{196,197}. It also results from

changes in trabecular cell contractility associated with an increase in transforming growth factor- β_2 (TGF- β_2) in the aqueous humor (AH) ^{198,199}. These pathological changes lead to an increase in AH outflow resistance that raises IOP and subsequently affects the entire neuronal visual pathway through RGC degeneration mechanisms ²⁰⁰. These intricate mechanisms could explain some treatment failures and glaucoma progression when some of them are not taken into account. Therefore, new therapeutic strategies that can encompass all the facets of the disease with appropriate targets – IOP-lowering medications as well as neuro- and TM-protective agents – are still much in need.

MSCs have also been proposed for the treatment of retinal diseases such as glaucoma¹³⁵, retinitis pigmentosa¹⁰⁶ and age-related macular degeneration²⁰¹. In a mouse glaucoma model, Manuguerra-Gagné et al. have reported that MSC injection into the anterior chamber could induce trabecular meshwork regeneration and reactivate local neural progenitors in the ciliary body pigmented epithelium⁷⁴. However, this study did not examine the molecular mechanisms of trabecular meshwork protection and the effect on retinal ganglion cell loss.

Here, we aimed to define the ability of bone marrow-derived MSCs to reduce IOP and protect the integrity of TM cells and RGCs from death. Therefore, we first analyzed the impact of MSC intracameral injection on lowering IOP in a preclinical model of ocular hypertension induced by episcleral vein cauterization (EVC). Then we assessed the neuroprotective potential of RGCs subsequent to a decrease in IOP induced by MSC intracameral injection. To decipher the mechanisms involved in the MSC-dependent decrease in IOP, we performed *in vitro* experiments to assess the effect of MSC-CM on primary human trabecular meshwork (hTM) cell properties in terms of viability, contractibility, and expression of extracellular matrix (ECM) compounds. Finally, we analyzed the neuroprotective properties of MSCs on purified rat RGC cultures and evaluated the impact of MSC-conditioned medium (MSC-CM) on RGC survival and outgrowth. This MSC therapy may offer a new way to promote trabecular and neuronal protection to treat glaucoma, this severe sight-threatening disease.

METHODS

Animal

Fifty male 8-week-old Long-Evans rats weighing 300–350 g were purchased from Janvier Laboratories (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France). Animals were kept in pathogen-free conditions with food and water available *ad libitum* and housed in a 12-h light/12-h dark

cycle. Experiments were conducted in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology for the Use of Animals in Ophthalmic research.

Episcleral vein cauterization glaucoma model

A surgical model of ocular hypertension was induced in the right eye (RE) of each rat by cauterization of three episcleral veins after conjunctival dissection under general anesthesia – intraperitoneal injection of Ketamine 1000® 100 mg/kg (Virbac, Vauvert, France) and Xylazine 10 mg/kg (Bayer HealthCare, Whippany, NJ, USA) – as reported elsewhere [20, 21]. The left eye (LE) underwent conjunctival dissection only as control. After surgery, IOP was monitored every 5 or 6 days using a handheld tonometer (TonoLab®, Medtronic, Jacksonville, FL, USA) without sedation. Animals presenting low or unstable IOP during a 21-day period after the surgery were excluded. Animals were treated 21 days after the surgery and IOP was monitored every 3–4 days for 24 other days in a blind manner.

ELISA

The concentrations of TGF- β 2 in the anterior chamber of cauterized eyes (RE) and contralateral eyes (LE) were measured using ELISA (DuoSet® DY302, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). AHs were sampled from hypertensive eyes 21 days after surgery and pooled to obtain at least 50 μ l/assay. Ninety-six-well plates were coated overnight with mouse anti-TGF- β 2 capture antibody; then nonspecific binding was blocked for 2 h with blocking buffer. Samples of AH or serial dilutions of standards of rat recombinant TGF- β 2 were incubated for 2 h, washed, then incubated with anti-TGF- β 2 detection antibody for 2 h, followed by a 20-min incubation period with HRP-conjugated streptavidin. Reaction product was detected using color reagent. The color absorbance was read (450–570 nm, Infinite1000®, TECAN, Switzerland) and averaged from ten measurements per well.

MSC isolation and conditioned medium collection

Bone marrow (BM) was obtained from femur cavities of 8-week-old Long-Evans rats (Janvier Labs) after flushing in minimal essential medium (alpha-MEM), 10% fetal calf serum (FCS), and 1% penicillin/streptomycin (PS) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cells were incubated in 75-cm² flasks (200,000 cells/cm²) at 37°C in 5% CO₂ humidified air. Nonadherent cells were discarded after 72h and MSCs were then routinely cultured till their use at passage 4.

At near confluence, the cell monolayer was washed before adding either serum-free DMEM+1% PS or serum-free Neurobasal® medium containing 2mM L-glutamine; 1%

gentamycin (Invitrogen) for 24 h. Supernatant was collected, centrifuged at 1200 rpm for 2min and stored at -80°C until further use for experiments on hTM (CliniSciences, Nanterre, France) and primary RGCs.

MSC injection and tracking system

Before injection, MSCs were washed with phosphate buffer solution (PBS), trypsinized, and labeled with Quantum Dot (QD) Fluorescent Nanocrystals (Qtracker[®] 655 Cell Labeling kit, Invitrogen). Cells were suspended in alpha-MEM for each injection (5×10^5 MSCs/6 μl). Cell suspension was checked under fluorescent microscopy for QD integration into MSCs.

MSCs were injected into the anterior chamber 21 days after EVC. IOP was measured every 3-4 days for 24 days in both eyes of each animal randomly distributed into three groups: (i) hypertensive eyes injected with 6 μl of MEM (EVC+MEM; $n=10$), (ii) hypertensive eyes injected with 6 μl of 5×10^5 MSC suspension (EVC+MSCs; $n=12$) and (iii) normotensive eyes injected with 6 μl of 5×10^5 MSC suspension (MSCs; $n=5$).

During injection, animals were maintained under general anesthesia using isoflurane inhalation (induction 5%, then 2%). The injection was performed through a glass capillary (TransferTip[®], Eppendorf; Hauppauge, NY, USA) under a binocular surgical microscope (Leica F18, Leica-microsystems; Nanterre, France).

Immunostaining

At the end of the experiments, the animals were euthanized and the eyes were immediately removed, fixed in 4% paraformaldehyde for whole flat-mounted cornea and retina microdissections, or embedded in an optimal cutting-temperature compound for snap-freezing (OCT, Tissue-Tek, Bayer Diagnostic, Puteaux, France). Retinas were incubated for 2h in a blocking-permeabilizing solution of PBS containing 10% bovine serum albumin (BSA; Vector Labs, Burlington, ON, Canada), Triton 2% and Tween20 0.5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Samples were incubated for 3 days at 4°C with unlabeled mouse anti-Brn3a 1/100 (Merck; Darmstadt, Germany), washed with PBS six times for 20min and mounted in FluoromountTM (Sigma-Aldrich).

To visualize QD-labeled MSCs using fluorescent microscopy, flat-mounted corneas and eye cryosections (12mm-thick) were incubated in the blocking-permeabilizing solution (10% BSA, 2% Triton and 0.5% Tween20) before actin fibers and nuclei staining with Phalloidin (Life Technologies; Carlsbad, CA, USA) and DAPI (Vectashield; Vector Labs, Burlingame, CA, USA) respectively. Whole flat-mounted retina and cornea were scanned with the Hamamatsu Nanozoomer Digital Pathology (Hamamatsu Photonics; Tokyo, Japan).

Magnifications were performed with a laser-scanning confocal microscope (FV1000, Olympus; Philadelphia, PA, USA). Acquisitions were conducted using the Olympus Fluoview software version 4.1.

Western blot analysis

Cell monolayers were homogenized in lysis buffer (25mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Triton, 0.1% SDS) with a protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Cell homogenates were centrifuged (10,000rpm; 10min; 4°C). Protein concentrations were measured using Bradford reagent (Sigma-Aldrich). Equal amounts of total protein were denaturized for 10min at 95°C (5µg) with NuPage reducing agent (Invitrogen) before electrophoresis in 4%-12% Tris-Glycine gel (Novex; Invitrogen); the membranes were transferred to nitrocellulose, blocked with TBS-Tween 0.1% + Blotting Grade blocker 5% (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at room temperature for 2h and probed overnight at 4°C with antibodies against β -actin (1:10,000; Sigma-Aldrich), phospho-Akt (p-Akt; 1:500; Cell Signaling; Danvers, MA, USA) and phospho-myosin (p-MLC; 1:500; Cell Signaling). The membranes were washed three times with TBS-Tween 0.1% and incubated for 30min with the appropriate secondary antibody (1:10,000) peroxidase-conjugated. Cells were detected using an enhanced chemiluminescence reaction using ECL Plus detection reagents (GE Healthcare, Orsay, France). Protein bands were quantified by densitometry using ImageJ software and the results expressed as the protein of interest/ β -Actin ratio.

Real-time PCR

Total mRNA from cell monolayers was extracted using the NucleoSpin RNA II extraction kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). RNA content was measured using a NanoDrop detector (ND-1000 spectrophotometer); cDNA was synthesized from equal amounts of RNA (800ng) using Multiscribe reverse transcriptase (TaqMan Reverse Transcription Reagents, Applied Biosystems, Life Technologies). Sample concentrations were adjusted to 5ng/µl cDNA. The reaction mixture containing 25ng cDNA/well was preheated at 95°C for 10min, followed by 40 cycles (95°C/15s and 60°C/1min). Each assay, carried out in triplicate, was normalized by amplifying the housekeeping cDNA HPRT (ID Hs02800695). Target cDNA was amplified using the 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) with assays-on-demand primers for human α -SMA (ID Hs00426835m1), type III (ID Hs00943809) and type IV (ID Hs00266237) collagen (Applied Biosystems). Relative quantification of target mRNA was assessed according to the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$); results are presented as the relative fold change compared to unstimulated control.

Human trabecular cell culture and treatment

hTM cells were obtained from 24-year-old adult donors (CliniSciences). Cells were maintained in culture at 37°C in an atmosphere of 95% air and 5% CO₂ in DMEM+10% heat-inactivated (56°C, 60min) FCS+1% PS.

After trypsinization, 10⁵ hTM were seeded in six-well plates and tested in different conditions: serum-free DMEM (Control) or 20ng/ml of exogenous TGF-β₂ (TGF-β₂) or MSC-CM (MSC-CM) or association of TGF-β₂ (20ng/ml) and MSC-CM (TGF-β₂+MSC-CM). After washing, protein or RNA was recovered for 3 or 72h, respectively, after treatment with the adapted buffer, as described previously.

hTM luminescent viability assay

After trypsinization, 10⁵ hTM were seeded in 96-well plates. Cells were exposed 24h later to an increasing concentration of benzalkonium chloride (BAC, Santen Pharmaceutical) from 1.5×10⁻⁴ to 5×10⁻⁴% for 24 h. In each well, half the volume of culture medium was removed and replaced by CellTiter-Glo® reagent (CTG, Promega; Madison, WI, USA). Ten minutes after adding CTG, the luminescent signal was measured in spectrophotometry (Infinite1000®, TECAN) to quantify the ATP content as an average from nine measurements/well.

Immunopanning

RGCs were isolated from the retina of 8-week-old Long-Evans rats with an immunopanning technique, according to protocols previously described [22]. Purified adult RGCs were seeded at 8,000 cells/well in 96-well plates and maintained in a humidified chamber at 37°C, 5% CO₂ for 6 days in neurobasal-A medium (NBA, Invitrogen) with 2mM L-glutamine (Sigma-Aldrich), 1% gentamycin as a negative control, in NBA+MSC-conditioned medium (NBA+MSC-CM) or in B27 (50X; Invitrogen)-supplemented NBA (NBA+B27) as a positive control. Cell viability was evaluated by calcein green fluorescence using the live-dead test kit (Life Technologies).

Quantification of RGCs in whole flat-mounted retina

Eight microscopic images were captured using a ×20 objective of the peripheral and central area in whole flat-mounted retina labeled with Brn3a antibody with a Zeiss fluorescence microscope (Carl Zeiss SpA, Arese, Milan, Italy) equipped with a digital camera (Axio Cam HRC; Carl Zeiss) and image acquisition software (AxioVision; Carl Zeiss). Automatic quantification of RGC nuclei was assessed in a blind manner with MetaMorph software (Universal Imaging, West Chester, PA, USA).

Statistical analysis

Values are expressed as means \pm SEM. ELISA, WB and RT-qPCR data were analyzed using the one-way or two-way ANOVA test followed by the post-hoc test and nonparametric Mann-Whitney *t*-test. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6.03 (San Diego, CA, USA). All statistical tests were two-sided and performed at the significance level of $p<0.05$.

RESULTS

Glaucoma model validation: effects on IOP and aqueous humor TGF- β_2 levels.

An increase in the IOP levels is the main risk factor for the development of glaucoma [20] and it is correlated to an increase of TGF- β_2 in the AH [13, 14]. We therefore examined if our animal model of glaucoma was associated to an increased AH TGF- β_2 with the IOP increase. Cauterization of three episcleral veins induced a decrease in AH outflow and consequently an increase in IOP. Twenty-four hours after surgery, the mean IOP elevation in the cauterized eyes (RE) versus the contralateral eye (LE) was 8.5 ± 2.8 mmHg ($n=5$; $***p<0.001$) (Fig. 1A). IOP remained stable for approximately 6 weeks with an overall mean increase of 10.4 ± 2.0 mmHg in RE vs LE over this period of time (Fig. 1A). Moreover, the AH concentration of TGF- β_2 showed a significant twofold increase in the RE compared to the LE ($*p<0.05$) (Fig. 1B).

MSC transplantation decreases IOP in a rat model of ocular hypertension

To assess the therapeutic potential of MSCs in glaucoma, we evaluated the intracameral injection of MSCs in our model. Two days after the MSC injection, the IOP level in the EVC+MSC group decreased by 5.1mmHg, showing a significant difference compared to the glaucomatous rats injected with a MEM control solution (EVC+MEM group). The MSC-induced decrease in IOP remained significantly different from the EVC+MEM group for 13 days (Fig. 2A). To examine whether this IOP decrease was specific to the glaucomatous condition, we also injected MSC to control rats (no prior surgical intervention) having a normal ocular pressure (MSCs group). The IOP monitoring after the injection did not show any modification in IOP during the experiment in this group (Fig. 2A).

The average of seven measurements of delta-IOP (difference between RE-cauterized and LE-uncauterized eyes), from the time of injection to the day of sacrifice for each animal, was significantly lower in the EVC+MSC group than in the EVC+MEM group during this period.

Tracking MSCs in the anterior chamber after EVC

To investigate the origin of the IOP decrease induced by MSCs injection, we examined the ocular distribution of the MSCs after injection, in particular to determine if they were able to migrate into the TM and to survive. For long term tracing of the MSC fate, we used Quantum Dot Fluorescent Nanocrystal labeling. Six rats were injected with the labeled MSCs (5×10^5 MSCs). After fixation of the tissues, the distribution of MSCs in the anterior chamber (AC) was investigated in whole flat-mounted corneas. Twenty-four days after the injection of 5×10^5 MSCs, cells were found located near the iridocorneal angle, on the corneal endothelium and in the TM (Fig. 3A, B, and C). The higher magnification confirmed the intracellular integration of QD (Fig. 3C, x800). Another set of six injected rats were used for cryosectioning (Fig. 3D, E). As observed on flat-mounted corneas, QD-labeled MSCs were found on the corneal endothelium, on the iris, in the TM but also in the ciliary processes (Fig. 3E).

MSC transplantation improves *in vivo* peripheral RGC survival

After confirmation of the beneficial effects of MSCs on the IOP and their incorporation in the anterior structures of the eye, we investigated the MSCs' effects of MSC injection in the posterior part of the eye involved in glaucoma optic neuropathy and RGC degeneration. RGCs were immunostained with Brn3a antibody in whole flat-mounted retina. Images of the peripheral and central areas of the retina were taken (Fig. 4A). No significant effect was observed in the central retina on RGC density (Fig. 4B). However, the EVC+MEM group exhibited a significant 33% decrease ($p=0.016$) in RGC density in the peripheral retina compared to the control group. Interestingly, the RGC density in the peripheral retina of the EVC+MSC group was significantly higher as compared to the EVC+MEM group ($p=0.029$) (Fig. 4C). The density of RGCs in the peripheral retina of hypertensive eyes treated with 5×10^5 MSCs was not significantly different from the control normotensive non-cauterized group (LE eyes, $p=0.40$). MSC transplantation in the anterior chamber thus appeared to protect from the peripheral RGC degeneration in the EVC hypertension model.

MSC-CM induces trabecular meshwork primary cell survival and contractibility

To further understand the IOP decrease following MSC injection, we investigated *in vitro* the impact of the conditioned medium of MSCs (MSC-CM) on mechanisms involved in IOP regulation. To this end, we examined in hTM cells, the phosphorylation of both Akt, a transduction factor involved in survival mechanisms, and MLC, a cell process inducing deleterious TM contractility and AH outflow impairment. As TGF- β_2 is known to correlated

with the IOP levels in AH of glaucoma patients [13, 14] we exposed hTM cells to exogenous TGF- β_2 (20 $\mu\text{g/ml}$) for 3 h in standard culture medium \pm MSC-CM. Western-blot assays were performed to detect and quantify Akt and MLC phosphorylation (p-Akt, p-MLC respectively; Fig. 5A). hTM displayed a low level of p-Akt in control and TGF- β_2 culture conditions, whereas MSC-CM alone or with TGF- β_2 revealed a major increase in p-Akt (Fig. 5A). In this experimental condition, TGF- β_2 triggered a twofold increase in p-MLC (Fig. 5A). Interestingly, MSC-CM strongly inhibited the effect of TGF- β_2 on p-MLC induction (Fig. 5A). In fact, hTM exposed simultaneously to TGF- β_2 and MSC-CM showed a significantly lower level of p-MLC than cells exposed to TGF- β_2 alone. For both markers, a beneficial effect was observed when hTM cells were exposed to MSC-CM. Quantification of the p-MLC and p-Akt bands were presented in histograms ($n=4$) (Fig. 5B and 5C). We confirmed the MSC-CM activation of the anti-apoptotic pathway Akt on hTM culture. To examine if this increase in Akt expression could protect hTM cells in a pathological context, these cells were exposed for 24 hours to the cytotoxic effects of benzalkonium chloride (BAC), which was found to induce hTM cell death in a dose-dependent manner. When co-applying MSC-CM, we observed a shift in the LC50 toxicity of BAC. LC50 was 6.3×10^{-6} M for hTM alone instead of 7.8×10^{-6} M for hTM maintained in MSC-CM (Fig. 5D).

MSC-CM reduces trabecular mesenchymal transition in primary trabecular cells

TGF- β_2 is known to induce phenotype transition in different cell types (i.e., epithelial, endothelial or fibroblastic). This mechanism is responsible for the initiation of tissue fibrosis even in TM under glaucomatous conditions²⁰⁵. Therefore, we investigated the potential protective effect of MSCs on this trabecular mesenchymal transition through the analysis of genetic expression of two extracellular matrix compounds, collagen-3 and -4, and through a myofibroblast marker, α -SMA. First, we confirmed that hTM exposed to TGF- β_2 for 72 h acquired an increased mRNA expression of collagen-3 (Fig. 6A), collagen-4 (Fig. 6B) and α -SMA (Fig. 6C). Then we showed that this phenomenon was significantly reduced when cells were simultaneously exposed to TGF- β_2 and MSC-CM. MSC-CM alone did not modify mRNA levels (Fig. 6A, B, C). MSC-CM inhibited the TGF- β_2 -dependent phenotype transition in hTM.

MSC-CM improves survival and expansion of purified rat primary RGCs.

MSCs have been previously described to promote RGC survival *in vivo* after intravitreal injection^{135,136,184,191} and in retinal explants¹³⁶. Using a purified culture of adult rat RGCs, we investigated whether this MSC neuroprotective effect is mediated by a direct effect of the

MSC–CM on RGCs. To address this question, purified adult rat RGCs were seeded in 96-well plates and maintained in culture for 6 days in neurobasal medium (NBA) as a negative control, NBA+MSC-conditioned medium (NBA+MSC-CM) or in B27-supplemented NBA (NBA+B27) as a positive control. Cell survival was assessed with the calcein dye. After 6 days *in vitro*, higher densities of calcein-labeled RGCs were observed in the positive control (NBA+B27) as compared to the NBA negative control condition (Fig. 7). However, addition of MSC-CM in NBA medium induced an increase in RGC densities correlated with an increase in neuritic processes (Fig.7).

DISCUSSION

Since their identification by Friedenstein and colleagues in the 1970s²⁰⁶, interest in bone marrow-derived MSCs in various clinical contexts such as ischemic stroke^{115,193}, myocardial infarction^{113,207} and Crohn disease⁹⁴ has continuously grown. In the field of ocular diseases, bone marrow-derived MSCs have successfully been proposed to promote corneal healing^{147,150,208}, reduce dry eye in chronic graft-versus-host disease¹⁵⁶, to prevent photoreceptor degeneration^{106,201,209} and also in glaucoma to protect the RGCs from degeneration after intravitreal injection^{135,136,184,191}. In this study, we originally show that MSC transplantation into the anterior segment of the eye induces RGC protection, through TM function and integrity improvement and IOP reduction.

The present EVC hypertension model, we observed that a stable elevation in IOP was associated with an increase in TGF- β_2 concentrations in AH, as observed in glaucomatous patients^{198,199}. We showed that a single injection of MSCs into the anterior segment of hypertensive rat eyes is able to rapidly and significantly reduce the increase in IOP induced by EVC. These results are in agreement with Manuguerra-Gagné et al. in another preclinical glaucoma model in mice induced by 180° TM laser photocoagulation⁷⁴. Manuguerra-Gagné et al. have recently demonstrated that MSC transplantation into laser-induced hypertensive eyes of mice progressively reduces IOP and attains a maximal effect at 10 days post-injection until the end of their 25-day study. In our study, the IOP lowering was seen as soon as 3 days after injection and was maintained for 13 days. This difference could be attributed to the different ocular hypertension animal models used. Indeed, in the laser model, half of the entire TM was destroyed, compared to the EVC model, in which TM was not directly damaged and the TM injury was progressive and secondary to the increase in IOP²⁰².

Twenty-three days after Quantum Dot-labeled MSC transplantation, we demonstrated that MSCs were distributed within the anterior chamber, especially inside and around the TM. A time-dependent reduction in the number of QDs per cell was observed, confirming *in vitro* data of MSC proliferation (data not shown). Carboxyfluoresceinsuccinimidyl ester (CFSE) cell tracking of high proliferative cells could rapidly result in undetectable fluorescence levels by microscopy, especially on autofluorescent tissues such as TM. In contrast, QD nanocrystals are stable with a very high fluorescence intensity and a resistance to metabolic degradation and thus remain sufficiently stable to be detected by fluoromicroscopy, despite the reduction in QD numbers per cell. These results differ from those reported in Manuguerra-Gagné's study, in which MSCs were no longer detected in the AC 96 h post-injection⁷⁴. These authors hypothesized that the injected MSCs escaped through the TM or died following their transplantation. QD staining is a more adapted system for tracking this type of cell, because it is able to show that MSCs remained integrated in the different parts of the anterior segment of the eye for a long period (at least 3 weeks) after injection into the AC.

While we demonstrated that MSCs were still present in the tissue after 3 weeks, the reduction in IOP induced by MSC injection in the AC only lasted for approximately 2 weeks. We presumed that this transient MSC effect results in either tissue resistance to MSC-CM or that the MSCs lose their ability to restore their tissue-filtrating property. It is known that the effect of MSCs is due to various molecules they synthesize and release. Furthermore, they progressively differentiate into the tissue type in which they are incorporated. Thus, we hypothesized that injected MSCs progressively trans-differentiate into specialized cells, which modify the nature of their sécrétome and finally lose their positive effect on the TM.

In glaucoma, TM degeneration features include cell loss, extracellular matrix remodeling, acquisition of a profibrotic phenotype and a defect in contractility/relaxation leading to IOP increase. Our work investigated whether MSC display valuable properties on these hallmarks. Using a cellular TGF- β_2 -induced model of glaucoma, we showed for the first time, that MSC-CM significantly decreased p-MLC induced by pretreatment of hTM with exogenous TGF- β_2 . Indeed, TM cells are known to acquire contractile properties in response to pharmacological stimulations. Several studies previously showed that inhibition of the actomyosin system is able to promote AH outflow^{210,211}. In our *in vitro* model, MSC-CM exert a positive effect on hTM through an increase in Akt phosphorylation (a serine/threonine kinase intracellular

pathway involved in cell survival). The activation of the Akt pathway by MSC-CM on hTM efficiently protects hTM from death in a BAC-induced cytotoxic *in vitro* model. Specifically, TM cell contraction has been reported to reduce AH outflow, whereas TM cell relaxation increased AH outflow facility and thus decreased IOP^{210,211}.

Growing interest is also focused on the trabecular to mesenchymal transition-like phenomenon concerning trabecular cells²⁰⁵. Indeed, this mechanism, occurring in chronic inflammatory disease, is defined as initiating fibrosis in different tissues. Here, we confirmed in human primary trabecular cells that exogenous TGF- β 2 was able to induce TMT through the increase of extracellular matrix (ECM) compound mRNA such as collagen-3 and -4 and the myofibroblast marker, α -SMA. As previously shown in other fibrosis models in various tissues^{63,64}, we also observed that MSC-CM significantly reduced collagen-3 and -4 and the increase in α -SMA mRNA induced by TGF- β 2 confirmed that MSC-CM could be useful to block TM fibrosis. Thus, we showed the direct impact of MSC-CM *in vitro* on TM cell survival, contractibility; and the reduction of the profibrotic phenotype. These specific *in vitro* effects of MSC-CM on TM cells could explain the rapid, although transient, *in vivo* IOP decrease observed after MSC injection.

In glaucoma, the loss of vision is related to the degeneration of RGCs. RGC protection after MSC intravitreal injection has been evidenced in different animal models of retina degeneration such as optic nerve crush²¹² or optic tract transection²¹³ and ocular hypertension induced by photocoagulation of the trabecular meshwork¹³⁵. More recently, the same conclusion has been deduced using organotypic retina explant cultures¹³⁶. The RGC protective effect conferred by MSC-CM in an integrative system is now accepted, but the specific mechanism by which it occurs remains unknown. Here, using a purified rat RGC primary culture model, we demonstrated that MSC-CM directly influences RGCs through specific effects on survival and outgrowth.

We originally demonstrate in this work that MSC injection into the AC of hypertensive eyes of the rat are able to protect peripheral RGCs from death. In fact, the hypertensive eyes injected with MSCs (EVC+MSC) did not develop the significant loss of peripheral RGCs (8%, $p=0.40$) that was observed in the EVC+MEM group (33%, $p=0.016$). RGC density in the peripheral retina was significantly higher in MSC-injected hypertensive eyes. Peripheral RGCs are known to be more sensitive than central RGCs to high IOP, as shown by the retinal damage characterization in the ocular hypertension model^{202,214}. Because ocular hypertension

is the most important risk factor inducing RGC death in glaucoma, we suggest that the neuroprotective effect observed in the present work could be mainly due to the decrease in IOP secondary to MSC injection. However other neuroprotective mechanisms dependent on MSCs secreted molecules cannot be ruled out. On eye cryosections, we observed QD-labeled MSCs in ciliary processes, which is anatomically close to RGCs in the peripheral retina. This observation and the direct effect of MSC-CM on purified RGC culture previously described in terms of viability and expansion, has allowed us to consider a direct effect of biofactors secreted by transplanted MSCs on peripheral RGC survival. Moreover, these findings showing MSC presence in the ciliary processes could also explain the MSCs' proliferative effect on neural progenitor cells in the ciliary processes found by Manuguerra et al.⁷⁴. We propose that RGC protection from death is the result of the combined effects of at least the decrease in IOP and the presence of neurotrophic factors released by the transplanted MSCs.

The rationale behind using MSCs in glaucoma is based on pathophysiologic clues. First, the increase in TGF- β 2 levels in the AH of glaucoma patients induces phenotype changes through trabecular to mesenchymal transition resulting in fibrotic-like mechanisms involving cell apoptosis and extracellular matrix remodeling. Further, the peripheral RGC death leading to progressive vision loss justifies the potential therapeutic use of MSCs. MSC therapy is already used today, with promising therapeutic results, at the preclinical and early clinical stages for various degenerative/fibrotic diseases. Indeed, MSCs have already demonstrated remarkable neuroregenerative and neuroprotective functional effects in several central nervous system disease models including clinical studies^{114,193–195}. The safe use of MSCs in autologous transplantations has led to several clinical trials for acute (ischemic stroke, spinal cord injury) or chronic (Parkinson's disease) nervous system diseases. The eye is particularly attractive in that it has features that can rapidly advance cell therapy: it is readily accessible for injection and it allows direct visualization and monitoring of the impact of therapeutic interventions. Moreover, little or no side effects may occur since local ocular administration of MSCs should not have the same general impact related to systemic injections. Lastly, in contrast to embryonic or fetal stem cells, the safety profile of MSCs and the possibility of obtaining MSCs from individual patients allowing autologous transplantation would highly facilitate transfer to the clinic. Present result show that MSCs are a promising tool for treating ocular hypertension and retinal cell degeneration. Therefore, such an innovative approach could open many therapeutic avenues based on MSC therapy in glaucoma.

FIGURES

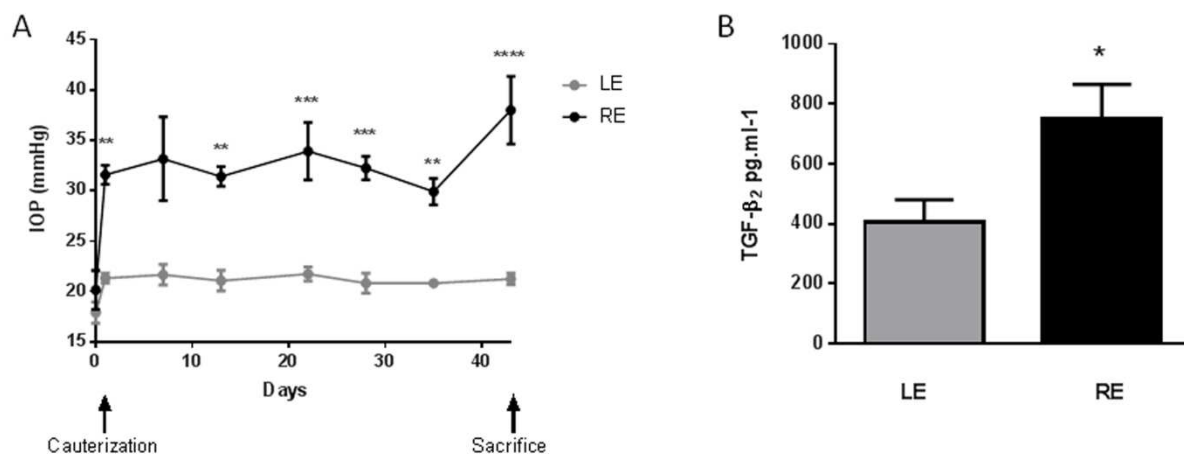
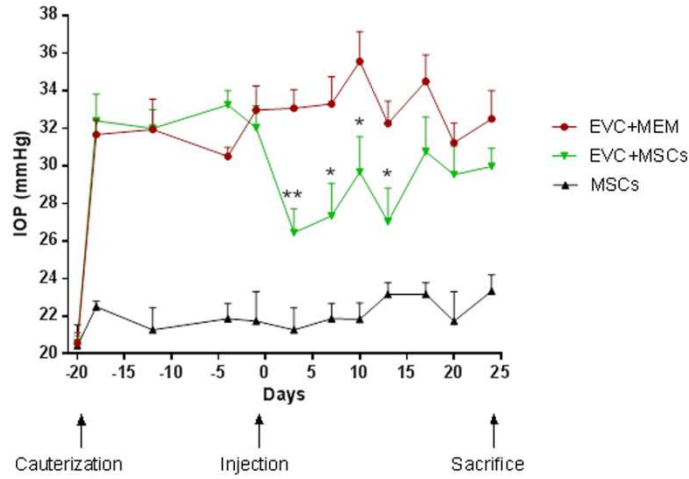


Figure 1: Effect of EVC on IOP and aqueous humor TGF-β₂ expression. IOP monitoring of right eyes (RE) exposed to three episcleral vein cauterizations (EVC) (black bar) and control left eyes (LE) (grey bar) over 44 days (A). AH levels of TGF-β₂ of both cauterized and control eyes sampled 21 days after EVC (B). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs control.

A



B

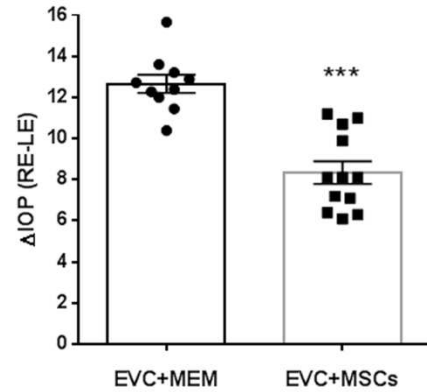


Figure 2: MSC transplantation decreases IOP in a rat model of ocular hypertension. The IOP was monitored in both cauterized (right eye; RE) and uncauterized eyes (left eye; LE). IOP measurements of RE were reported for each animal per group: hypertensive eyes injected with 5×10^5 MSCs (EVC+MSCs; $n=12$), hypertensive eyes injected with culture medium alone (EVC+MEM; $n=10$) or normotensive eyes injected with 5×10^5 MSCs (MSCs; $n=5$). IOP in hypertensive eyes injected with 5×10^5 MSCs and MEM are represented by the green and red bar, respectively (A). IOP monitoring of normotensive eyes injected with 5×10^5 MSCs are represented by the black bar (A). Individual average of delta IOP (RE IOP – LE IOP) measurements from injection to sacrifice times were calculated and compared between the EVC+MSCs and EVC+MEM groups (B). * $p<0.05$, ** $p<0.05$, *** $p<0.001$ vs EVC+MEM

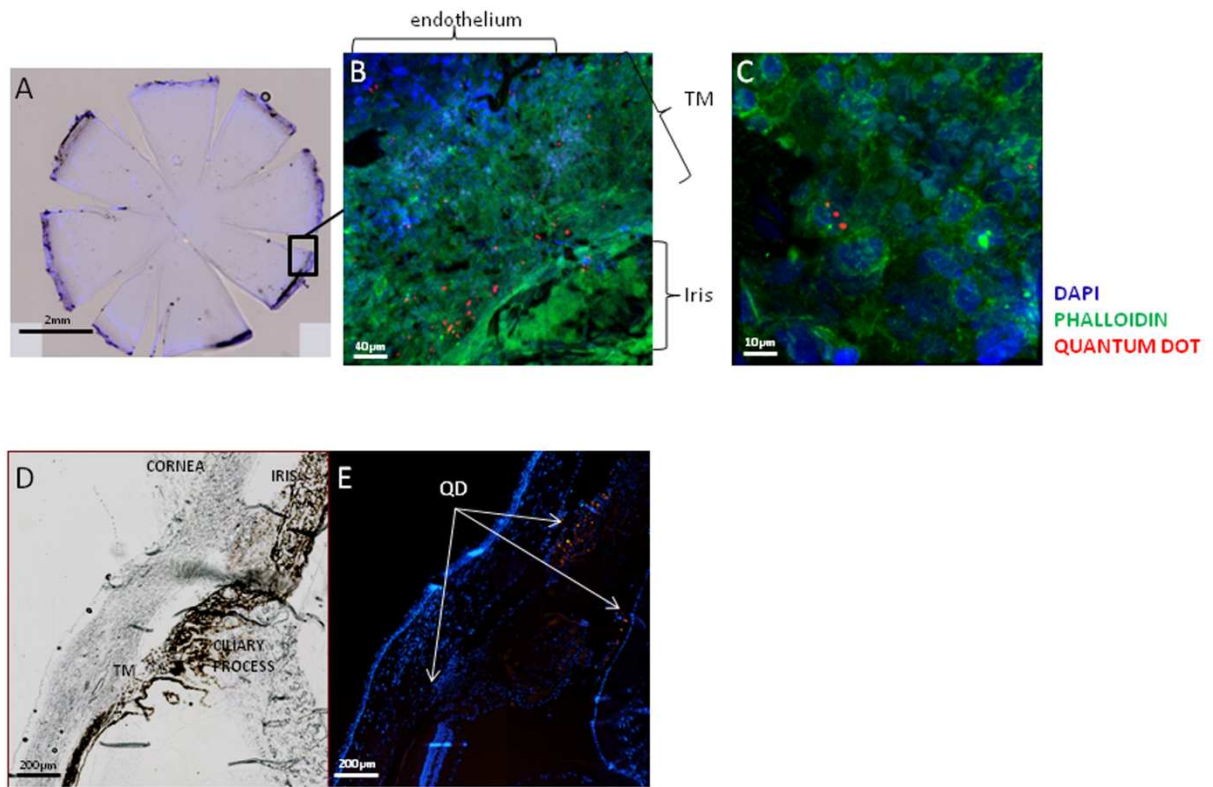


Figure 3: Tracking of MSCs after EVC in the anterior chamber. Whole flat-mounted cornea viewed with a digital fluorescence scanner (Nanozoomer) (A). Confocal microscopy images at two different magnifications (B $\times 200$; C $\times 800$) of flat-mounted cornea showing cell nuclei (DAPI; blue), actin fibers (Phalloidin; green) and QD-labeled MSCs (red) injected 21 days after EVC and found 23 days later at the time of sacrifice. Representative images of anterior-chamber angle with contrast phase (D) and fluorescence microscopy (E) showing cell nuclei (DAPI; blue) and QD-labeled MSCs on the cornea endothelium, ciliary processes and TM on cryostat section (red).

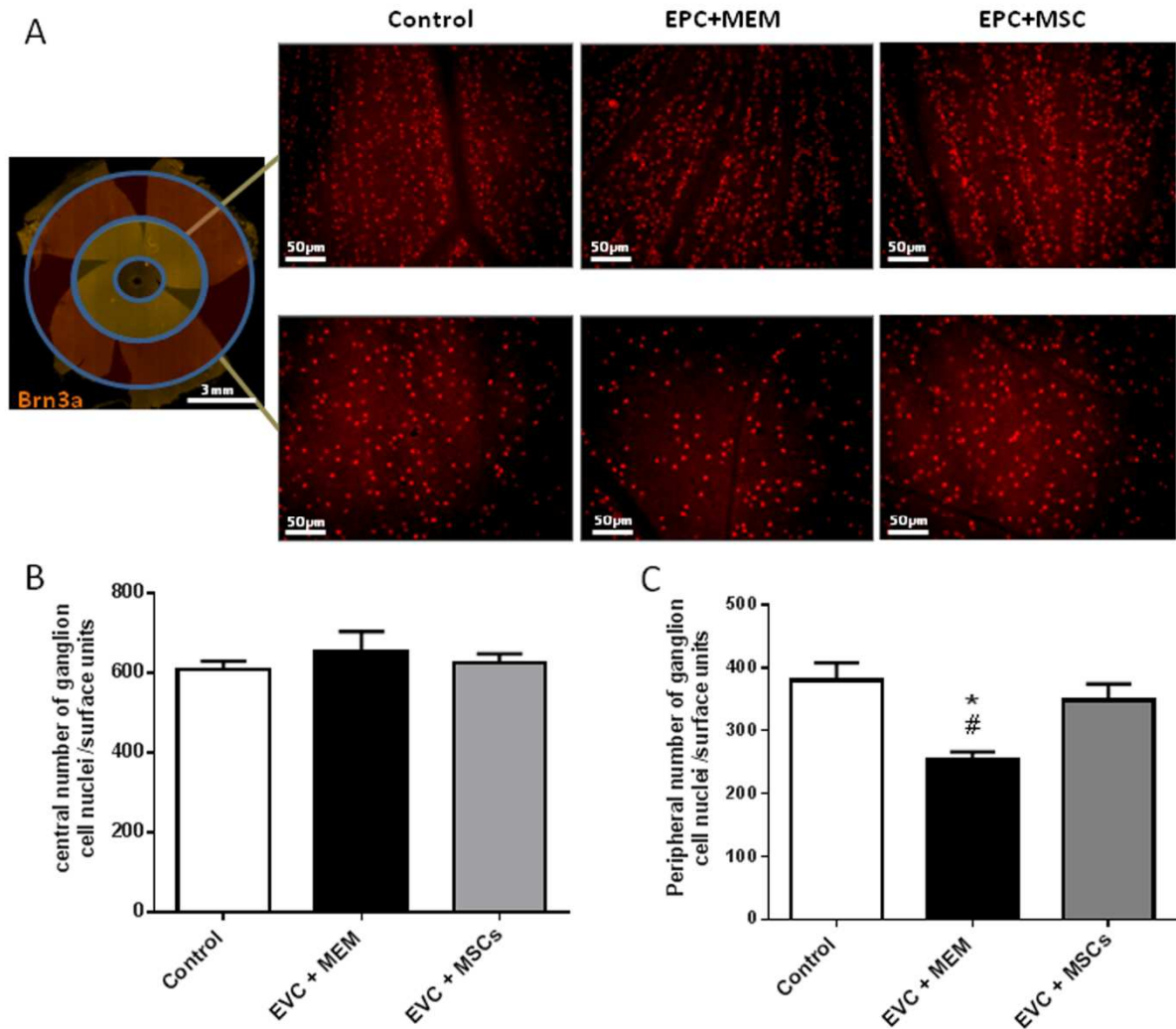


Figure 4: MSC transplantation improves RGC survival. Whole flat-mounted retina immunolabeled with Brn3a antibody. Representative images ($\times 200$) of the peripheral or central area showing immunopositive staining of RGCs in uncauterized (Control) and cauterized eyes injected with MEM (EVC+MEM) or MSCs (EVC+MSCs), respectively (A). Quantification of peripheral (B) and central (C) RGC densities per retina using automated nuclei counting in the control group ($n=5$); EVC+MEM ($n=5$) and EVC+MSCs groups ($n=5$). The average RGC density was obtained from eight peripheral and central images per retina and per area. Data are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.05$ vs control, # $p < 0.05$ vs EVC+MSCs

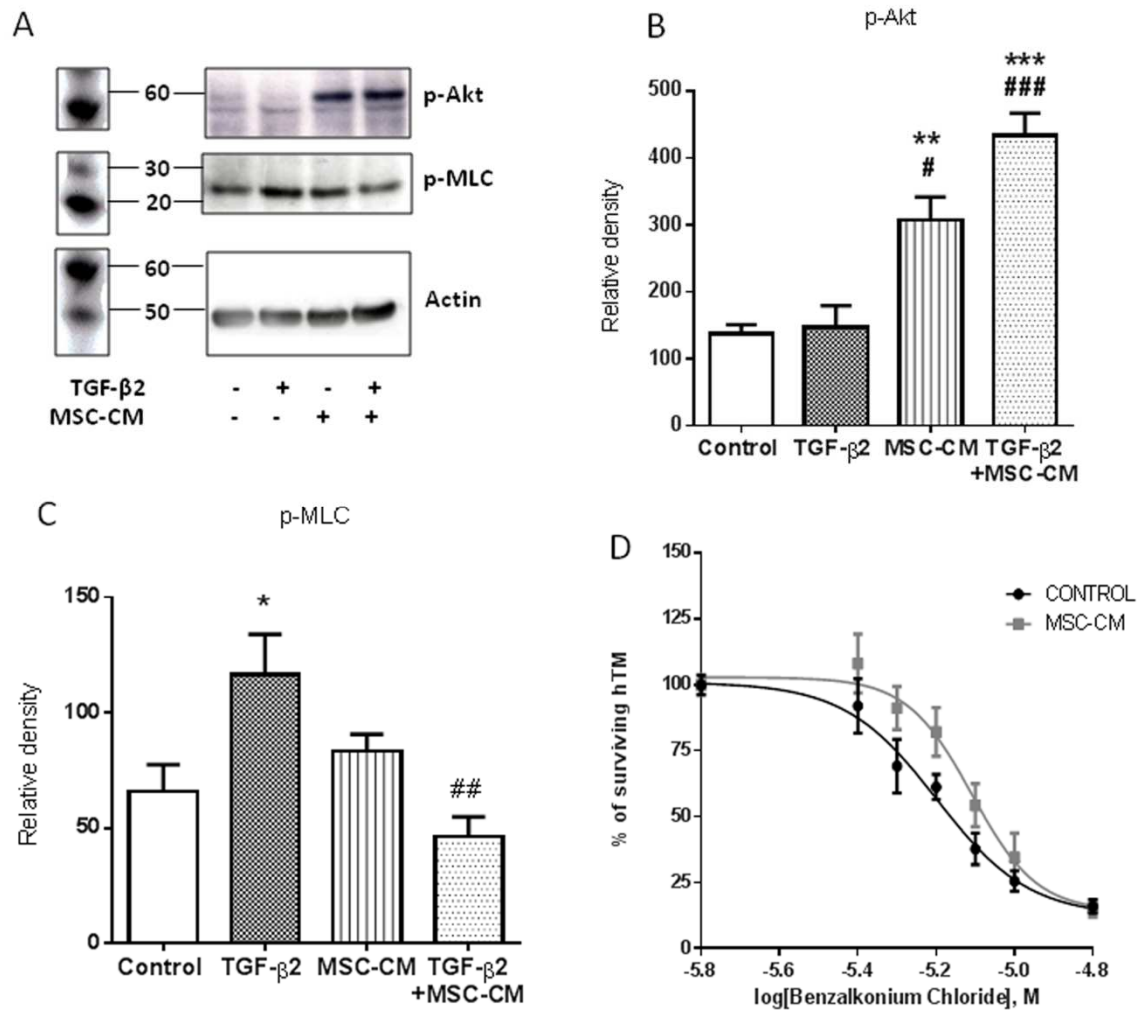


Figure 5: MSC-MC induces trabecular meshwork primary cell survival and contractility. Effect of MSC-CM on hTM survival and contractility with or without TGF- β 2. Immunoblot of p-Akt and p-MLC protein expression using Western blot in hTM cells in each culture condition (A). The relative density of protein bands were quantified, and the ratios of phosphorylated protein to actin were calculated (n=4) (B, C). hTM viability assessed by ATP quantification following 24 h of increasing BAC concentration exposure with or without MSC-CM (D). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs control culture condition. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ vs TGF- β 2 condition.

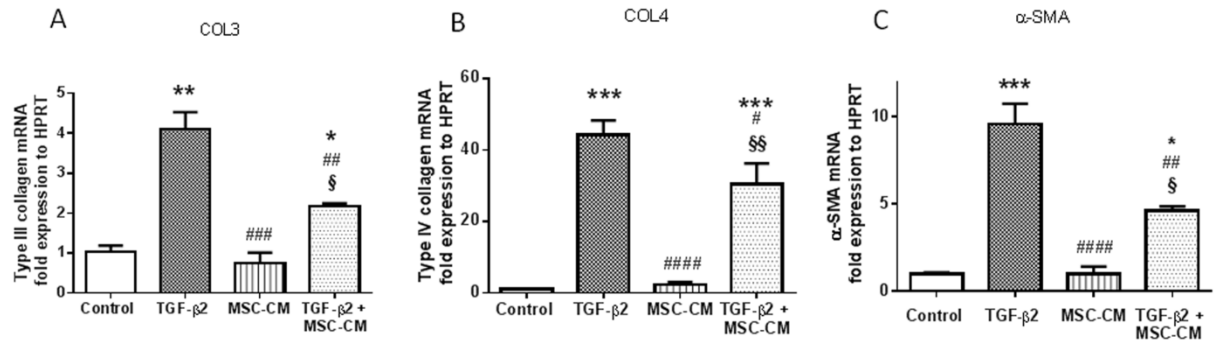


Figure 6: MSC-CM reduces epithelial mesenchymal transition-like phenomenon in primary trabecular cells. Effect of MSC-CM on TGF- β 2 induced collagen-3 (A), collagen-4 (B) and α -SMA (C) mRNA modification on hTM. The results are normalized to reference HPRT genes. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ and *** $p < 0.0001$ vs control culture condition. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$ vs TGF- β 2 condition. \$ $p < 0.01$ and \$\$ $p < 0.0001$ vs MSC-CM condition ($n=5$).

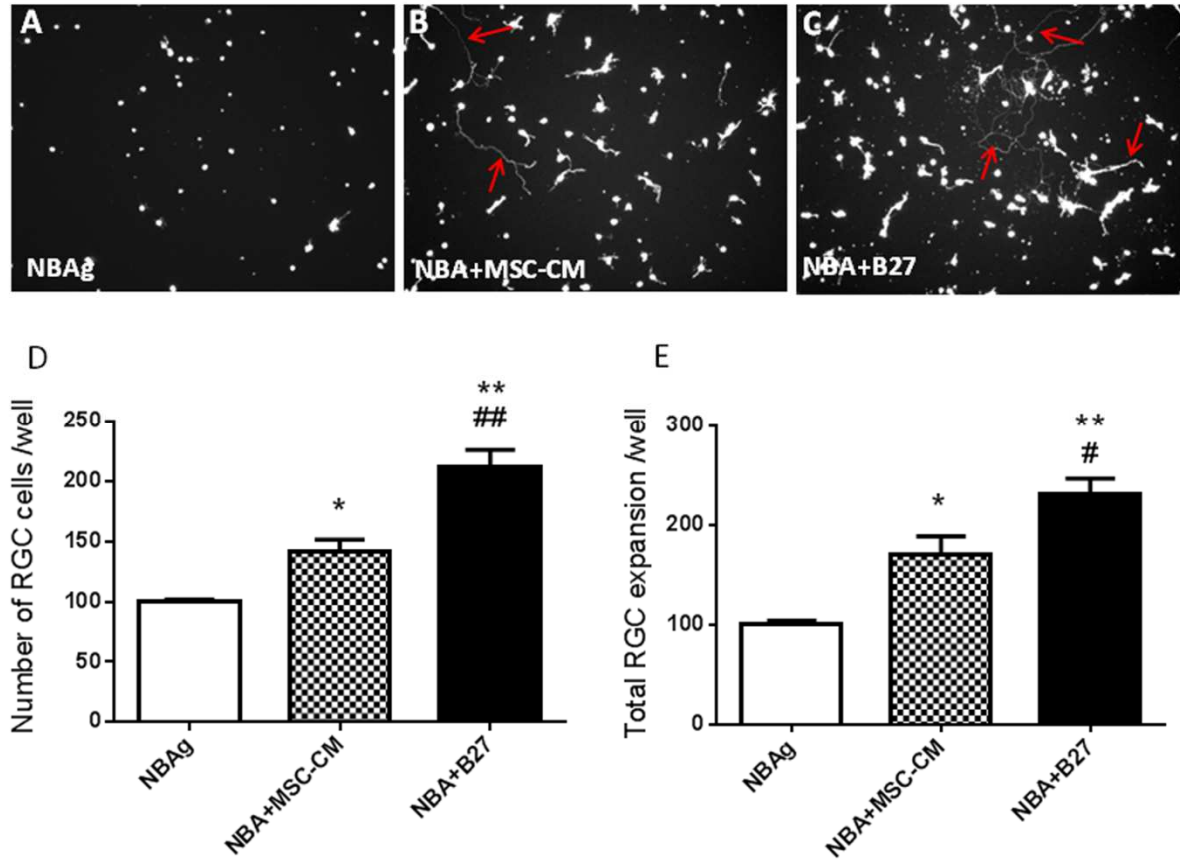


Figure 7: MSC-CM improves survival and expansion of purified rat primary RGC cultures. Representative images of pure RGC cultures showing viable cells labeled with calcein, after 6 days in vitro in neurobasal medium alone (negative control) (A), in MSC-CM (B) or in B27-supplemented NBA (positive control) (C). Quantification of RGC density (D) and RGC expansion (E) after 6 days in vitro, in each culture condition. The respective RGC density and expansion are expressed as percentages of the negative control at 6 days in vitro. Data are means \pm SEM from four independent experiments. * p <0.05, ** p <0.001 vs NBAg condition. # p <0.01, ## p <0.01 vs MSC-CM condition.

PROJET 2

(Projet en progression)

<p>CARACTÉRISATION DE LA NEUROINFLAMMATION DE LA RÉTINE ET DES VOIES VISUELLES CENTRALES DANS UN MODÈLE DE GLAUCOME CHEZ LE RAT</p>
--

INTRODUCTION

Le glaucome est une neuropathie optique progressive de la rétine généralement combinée à une augmentation de la pression intraoculaire (PIO). Cette augmentation de la PIO est due à une dégénérescence du trabéculum, le tissu responsable de la régulation de l'écoulement de l'humeur aqueuse (HA) dans la chambre antérieure de l'œil. Le principal facteur de risque identifié contribuant à la dégénérescence des cellules rétinienne est l'augmentation de la PIO. C'est pourquoi, la grande majorité des traitements pharmacologiques et chirurgicaux actuels visent à diminuer la PIO afin de ralentir la progression de la pathologie glaucomateuse.

Dans la pathologie glaucomateuse, les premiers neurones atteints du système visuel sont les cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs). Le corps cellulaire des CGRs se trouve dans la partie la plus interne de la rétine et leurs axones convergent pour former le nerf optique. Les CGRs ont des axones extrêmement longs (environ 50 mm), elles font des synapses avec les cellules bipolaires et amacrines de la rétine et conduisent l'information visuelle jusqu'au cerveau et dans le noyau géniculé latéral (Figure 1). L'augmentation de la PIO induit une dégénérescence des CGRs et de leurs axones au niveau du nerf optique. Les mécanismes précis conduisant à la dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs) ne sont pas encore bien décrits. Cependant, l'identification d'une réponse inflammatoire précoce au travers de l'activation des astrocytes et des cellules microgliales au niveau de la rétine laisse suggérer un rôle essentiel de l'inflammation dans la pathologie glaucomateuse. De nombreuses études cliniques et précliniques ont mis en évidence que les lésions neuronales ne se limitaient pas à la rétine mais qu'elles avaient un retentissement jusqu'au niveau des voies centrales de la vision^{200,215,216}.

Le but de ce projet est de caractériser les atteintes neuroinflammatoires, de la rétine aux relais centraux de la vision, en utilisant un modèle de glaucome par cautérisation des veines épisclérales (EVC) chez le rat. La caractérisation des mécanismes impliqués dans la dégénérescence des CGRs ainsi que du mode de transmission de la neuroinflammation au système visuel central devrait nous permettre de tester des traitements neuroprotecteurs et/ou de mieux comprendre leur mode d'action.

Les CGRs tapissent la couche la plus interne de la rétine et leurs axones convergent pour former le nerf optique. Les nerfs optiques des deux yeux se croisent au niveau du chiasma où environ 50% des fibres de chaque œil décussent (Figure 1). On distingue deux voies visuelles,

la voie rétino-géniculo-corticale, le noyau latéral géniculé (LGN) reçoit 90% des axones des CGRs qui font synapse pour ensuite projeter vers le cortex visuel (Cx). La seconde est la voie rétino-colliculaire, 10% des axones des CGRs projettent directement dans le colliculus supérieurs (SC).

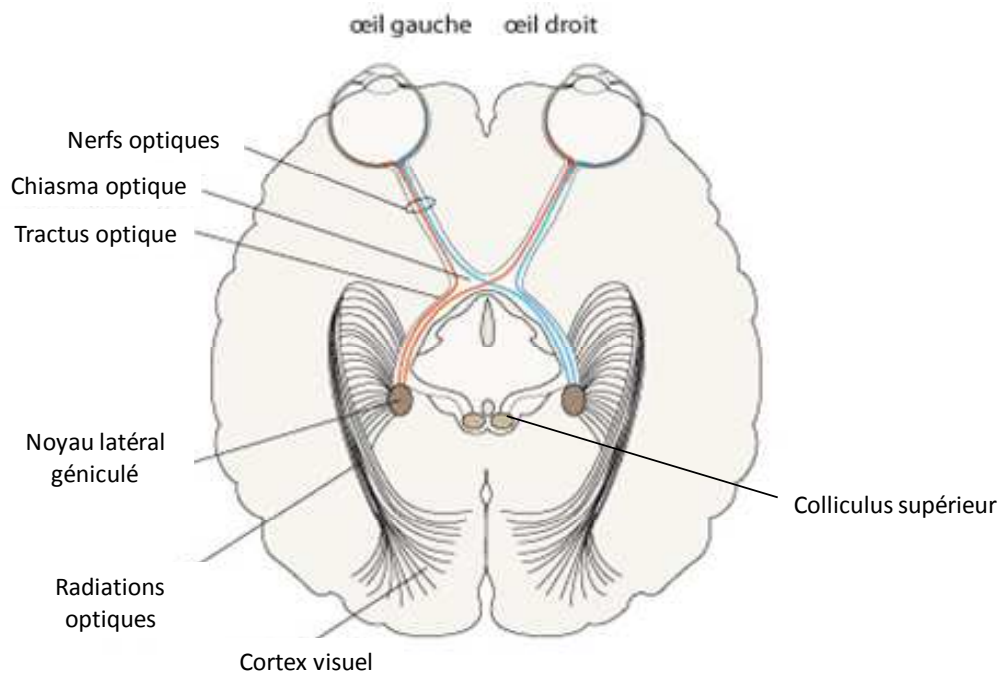


Figure 1. Les voies visuelles centrales

La cautérisation des veines épisclérales (3 sur 4) induit une diminution de l'écoulement de l'HA et donc une augmentation de la PIO (de 19.4 ± 1.4 à 33.1 ± 2.4 mmHg) stable pendant plus de six semaines (Figure 2A). Les rétines ont été disséquées sous microscope et les CGRs marquées à l'aide d'anticorps anti-Brn3a. Le modèle de glaucome par EVC induit une perte d'environ 33% de la densité des CGRs en périphérie de la rétine (B, C).

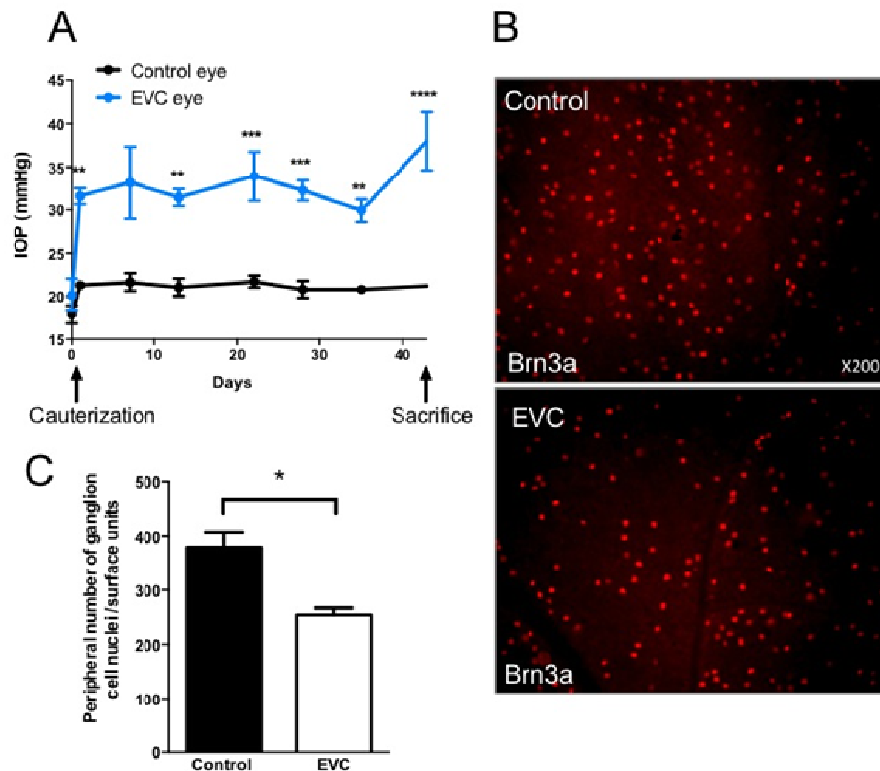


Figure 2. La cautérisation des veines épisclérales entraîne une augmentation de la PIO et la mort des CGRs. (A) Pression intraoculaire (en mmHg) des yeux contrôles et EVC (cautérisés) suivie pendant 42 jours après la cautérisation. (B) Marquage en immunofluorescence des CGRs (Brn3a) sur rétine à plat. (C) Comptage des CGRs en périphérie de la rétine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM et * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$

Neuroinflammation rétinienne

L'analyse par comptage automatisé (MetaMorph) révèle une augmentation de la densité microgliale (Figure 3B) à la périphérie des rétines EVC versus contrôles. De plus, une augmentation de la quantité de cellules microgliales activées, c'est-à-dire présentant un renflement du corps cellulaire et un raccourcissement des dendrites, a été observée (Figure 3A, C). Enfin, nous avons observé une augmentation du nombre de microglies au niveau des noyaux des cellules bipolaires, amacrines et horizontales révélant une migration de la microglie des couches plexiformes vers la couche nucléaire interne (INL)(Figure 3D, E).

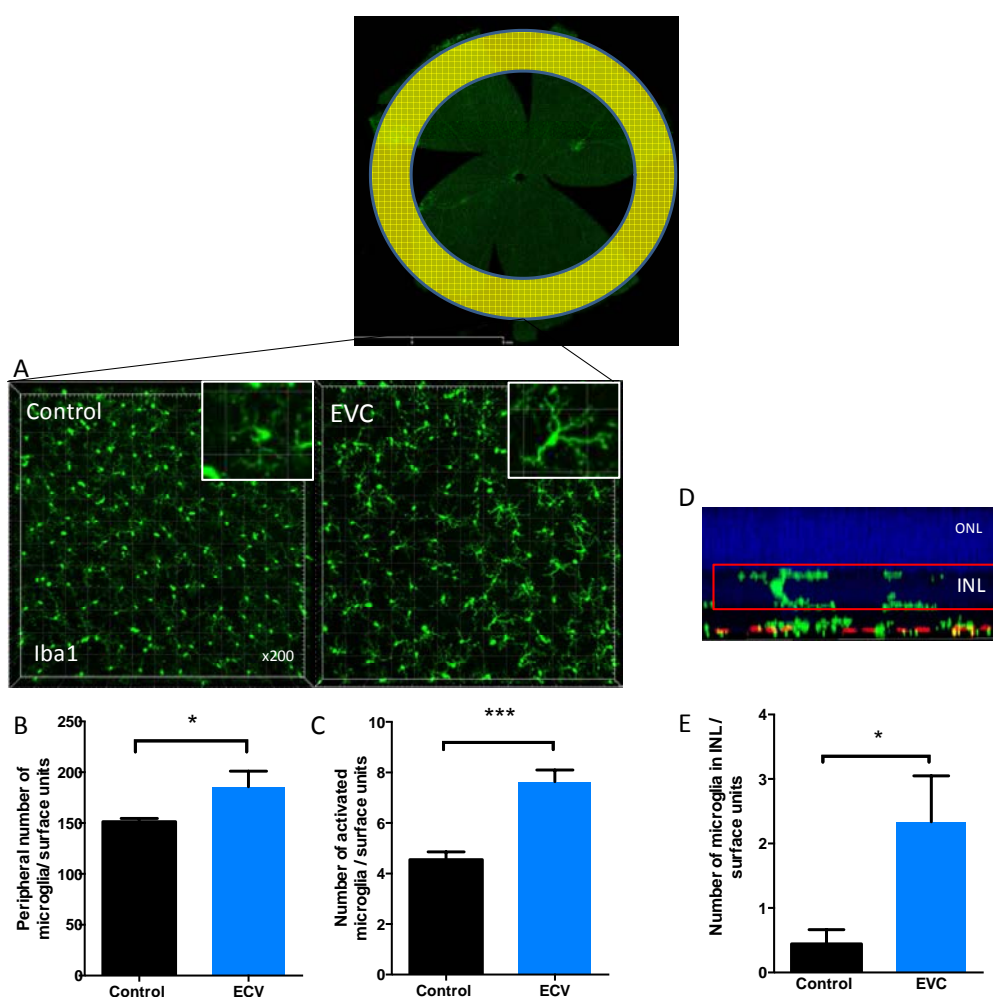


Figure 3. L'hypertension oculaire induit une augmentation du nombre de cellules microgliales dans la rétine après six semaines d'hypertension oculaire. (A, D) Marquage en immunofluorescence de la microglie (Iba1) dans les rétines contrôles et EVC. (B) Comptage automatisé en périphérie de la rétine de l'ensemble des microglies (C) des microglies activées uniquement et (E) du nombre de microglies présentes dans la couche nucléaire interne (INL). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM et * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$

La quantification relative des ARNm montre une induction significative de la synthèse des ARNm codant pour la GFAP et ITGAM témoignant d'une réaction microgliale et astrocytaire. De plus, l'expression de marqueurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1 β et CCL2 confirme un état inflammatoire de la rétine. La surexpression du marqueur NADPH oxydase 2 (Nox2), enzyme impliquée dans la production d'espèces réactives de l'oxygène, suppose la présence d'un stress oxydant dans les rétines EVC (Figure 4).

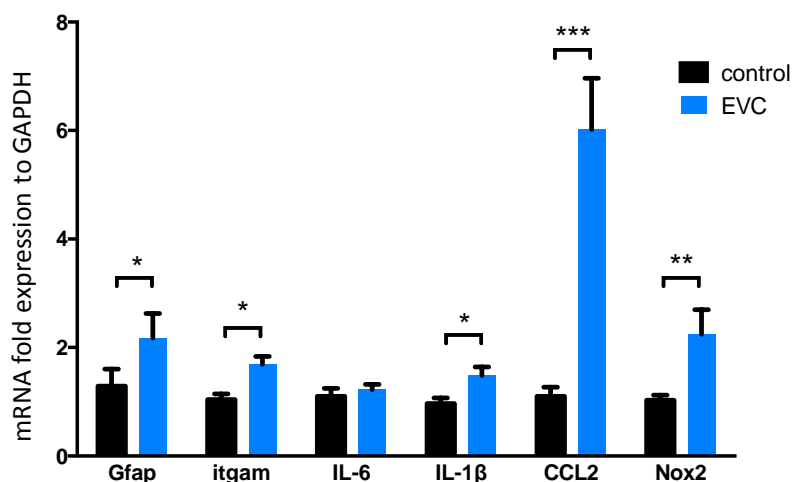


Figure 4 : Le modèle d'EVC induit une inflammation de la rétine après six semaines d'hypertension oculaire. RT-qPCR de l'effet de l'hypertension dans les rétines contrôles et EVC. Pour chaque marqueur, les niveaux d'ARNm sont présentés comme un facteur de variation par rapport au lot témoin après normalisation avec le gène de ménage GAPDH. Les résultats sont exprimées en moyenne \pm SEM et * p <0,05, ** p <0,01 et *** p <0,001

Neuroinflammation des centres supérieurs de la vision

L'ensemble des structures centrales de la vision a été isolé soit par simple dissection soit par la méthode dite de « Palkovits » qui consiste à prélever les zones d'intérêt à partir de coupes de cerveau avec un emporte-pièce. La neuroinflammation rétinienne induite par le modèle d'hypertension oculaire se propage vers les voies centrales de la vision le long des axones des CGRs. Par immunofluorescence, nous avons pu mettre en évidence que l'activation microgliale observée au niveau rétinien est également trouvée au niveau des nerfs optiques des yeux cautérisés, mais également au niveau des voies optiques (Figure 5).

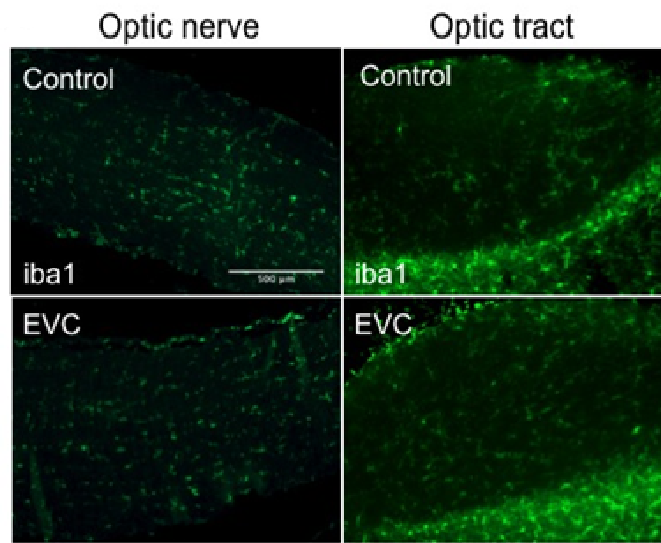


Figure 5 : Le modèle d'EVC induit une activation microgliale dans le nerf optique et dans le chiasma optique. Marquage en immunofluorescence de la microglie (Iba1) dans les nerfs et les tractus optiques contrôles et EVC.

L'analyse par RT-qPCR des LGN révèle une augmentation de l'expression des ARNm codant pour la GFAP indiquant une activation astrocytaire. La faible quantité de tissus ne nous a pas permis d'évaluer le niveau d'expression de nombreux marqueurs (Figure 6A). L'analyse des colliculi supérieurs montre une augmentation des ARNm codant pour la GFAP, Itgam, BDNF, Nox2 et Nox4 (Figure 6B). Enfin, les RT-qPCR ne montre pas d'augmentation d'expression d'aucun de ces marqueurs au niveau des cortex visuels.

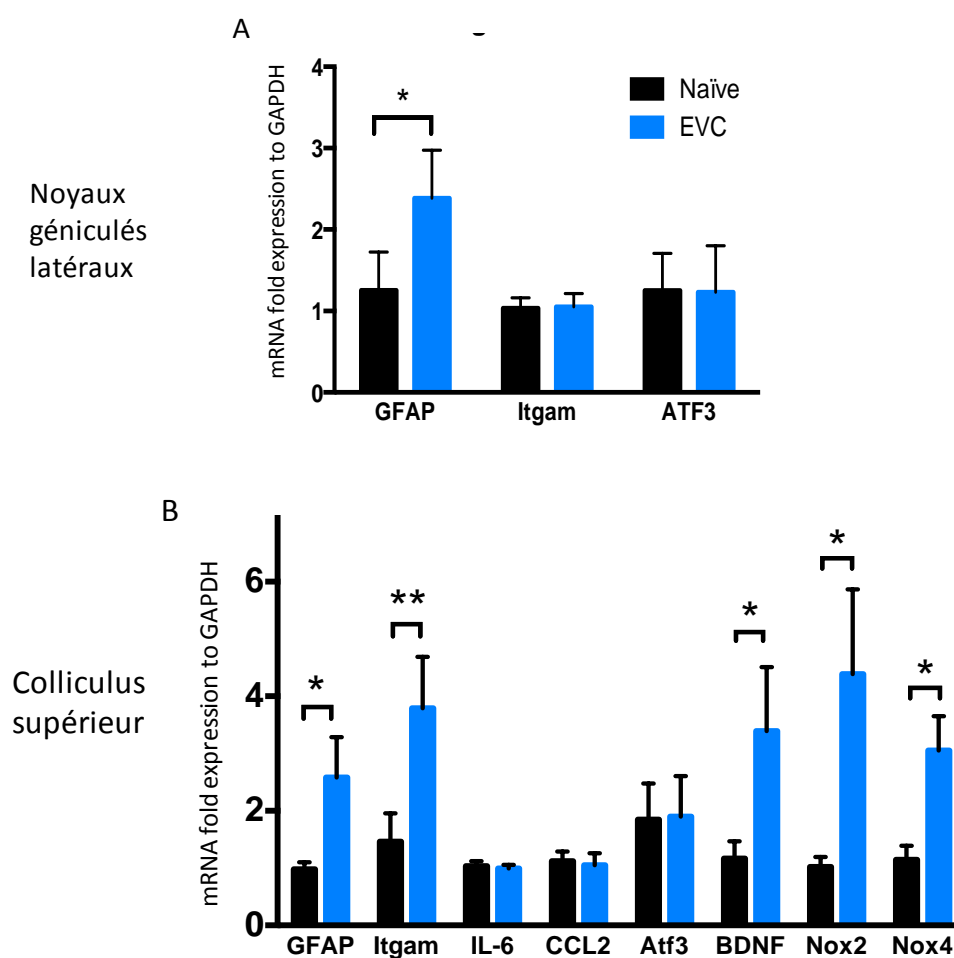


Figure 6. Le modèle d'EVC induit une neuroinflammation dans les centres supérieurs de la vision. (A) RT-qPCR de l'effet de l'hypertension oculaire dans les noyaux latéraux géniculés (B) et les colliculi supérieurs (C) contrôles et EVC sur les niveaux d'expression des ARNm. Pour chaque marqueur, les niveaux d'ARNm sont présentés comme un facteur de variation par rapport au lot témoin après normalisation avec le gène de ménage GAPDH. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM et * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$

DISCUSSION

L'augmentation de la PIO induit une dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine, cependant les mécanismes impliqués ne sont pas encore bien compris. Les CGRs possèdent des axones très longs et fins et dont le transport axonal dépend de l'intégrité de son cytosquelette²¹⁷. A partir de la sixième semaine d'augmentation de PIO, une dégénérescence des CGRs est observée préférentiellement en périphérie de la rétine²¹⁸. Les CGRs en périphérie de la rétine possèdent des axones plus longs ce qui pourrait être à l'origine de leur plus grande sensibilité aux variations de PIO.

L'analyse des rétines périphériques des yeux glaucomateux révèle une activation microgliale importante. Elle est caractérisée par une augmentation de la densité et de l'activation des microglies dans la zone inflammatoire et également par l'augmentation des ARNm codant pour ITGAM. Cette réaction microgliale est un signe précoce de souffrance neuronale. Elle peut à la fois participer à l'amplification de la lésion par la libération de cytokines pro-inflammatoires et d'espèces réactives de l'oxygène mais elle peut également participer à la neuroprotection. En effet, la réaction microgliale pourrait protéger, notamment par son activité de phagocytose, les CGRs de la dégénérescence secondaire, c'est-à-dire, provoquée par des facteurs délétères libérés lors de la dégénérescence primaire des neurones et des cellules gliales²¹⁹.

Cette dégénérescence se répercute tout le long des axones des CGRs jusqu'aux premiers relais centraux de la vision, c'est-à-dire le nerf optique, le chiasma, le noyau géniculé latéral et le colliculus supérieur. L'expression de marqueurs de stress oxydant comme Nox2 et 4 est augmentée au niveau des colliculi supérieurs. Ce stress oxydant pourrait être associé à l'effet toxique du glutamate qui, lors d'atteinte cérébrale, s'accumule au niveau synaptique et induit ainsi la production de ROS²²⁰. L'augmentation de la production de BDNF est probablement liée à la réaction astrocytaire (GFAP) puisque les astrocytes produisent de tels facteurs neurotrophiques.

Ce modèle nous apporte une meilleure compréhension des mécanismes neuro-inflammatoires au cours de la pathologie glaucomateuse et devrait nous permettre de tester des stratégies thérapeutiques afin de prévenir les souffrances/dégénérescences neuronales dans la rétine et dans les centres supérieurs de la vision.

PROJET 3

(Projet en progression)

<p>DÉVELOPPEMENT D'UN MODÈLE INFLAMMTOIRE DE SÉCHERESSE OCULAIRE <i>IN VITRO</i></p>

INTRODUCTION

La sécheresse oculaire est une pathologie multifactorielle due à une mauvaise hydratation de la surface oculaire, provoquant une hyperosmolarité des larmes, des sensations de gêne et d'inconfort et pouvant conduire à des troubles de la vision²²¹. La surface oculaire (SO) comprend plusieurs structures qui protègent l'œil des agressions de l'environnement : les paupières, le film lacrymal, les épithéliums, les glandes lacrymales ou encore les nerfs. Lorsque l'une de ces structures ne joue plus son rôle, la SO est alors exposée à des stress environnementaux répétés qui vont conduire à l'installation d'un état pathologique chronique où l'inflammation joue un rôle central¹⁵⁸. Dans ce contexte pathologique, les épithéliums cornéen et conjonctival de la SO sont exposés directement aux agressions environnementales et vont participer à l'installation de cette inflammation chronique en produisant une grande quantité de cytokines/chimiokines. La majorité des traitements actuels vise à protéger la SO par apport de larmes artificielles. Cependant, une meilleure compréhension des mécanismes pathologiques de la sécheresse oculaire conduit aujourd'hui au développement de traitements anti-inflammatoires.

Dans ce travail, nous avons mis au point un modèle de sécheresse oculaire *in vitro* par dessiccation. Ce modèle a pour but d'identifier les protagonistes inflammatoires sécrétés par les cellules cornéennes humaines (HCE) et conjonctivales (WKD), de comprendre les modes d'actions de certains traitement et enfin de tester de nouvelles approches thérapeutiques.

Par une méthode de criblage, nous avons caractérisé le phénotype pro-inflammatoire acquis par les HCE suite au SD au travers de la production de différentes cytokines/chimiokines dont le *macrophage migration inhibitory factor* (MIF). MIF est une *chemokine like function protein* (CLF). Elle a la particularité de se fixer sur des récepteurs présents à la surface des cellules épithéliales cornéennes et conjonctivales et notamment à la chaîne invariante du complexe HLA-DR²²² qui est le marqueur de référence pour le diagnostic et le suivi de la prise en charge des sécheresses oculaires²²³. De plus, MIF est massivement libéré par les HCE suite à un court SD (30min). Nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de MIF, ISO-1²²⁴, afin de déterminer si cette CLF avait un effet sur la synthèse par les HCE d'autres médiateurs inflammatoires dont l'expression est augmentée au cours du SD.

Nous avons développé un modèle de stress dessiccatif avec un insert de culture présentant une forte densité de pore de petite taille ($0,4\mu\text{m}$). Les cellules sontensemencées en couche monocellulaire sur l'insert. Après fixation des cellules, le stress dessiccatif est réalisé par aspiration douce du milieu de culture de la chambre apical de l'insert et incubation dans une chambre à hygrométrie faible (Figure 1).

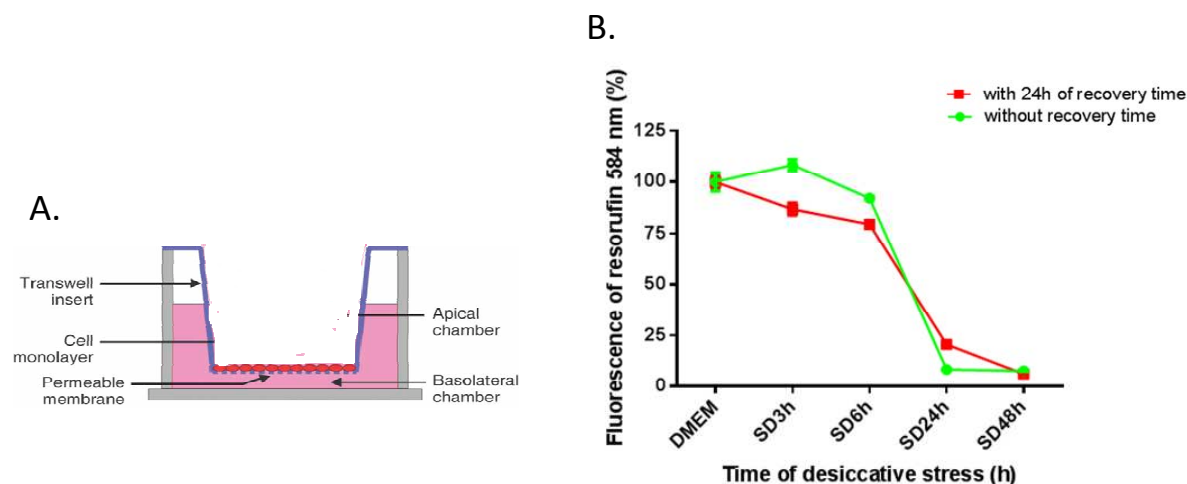


Figure 1: (A) Représentation du système de dessiccation *in vitro*. (B) Evaluation de la viabilité cellulaire chez les cellules humaines cornéennes HCE avec de l'Alamar Blue au cours du SD avec ou sans temps de récupération.

Nous avons ensuite déterminé l'effet de la dessiccation sur le profil d'expression en ARNm (Figure 2) et protéique (Figure 3) des HCE. Le SD induit une augmentation significative de la production cellulaire d'ARNm codant pour IL-6, CXCL1, IL-8/CXCL8, CCL2 et IL-1 β mais pas de MIF. Le niveau maximum d'induction est obtenu après deux heures de dessiccation.

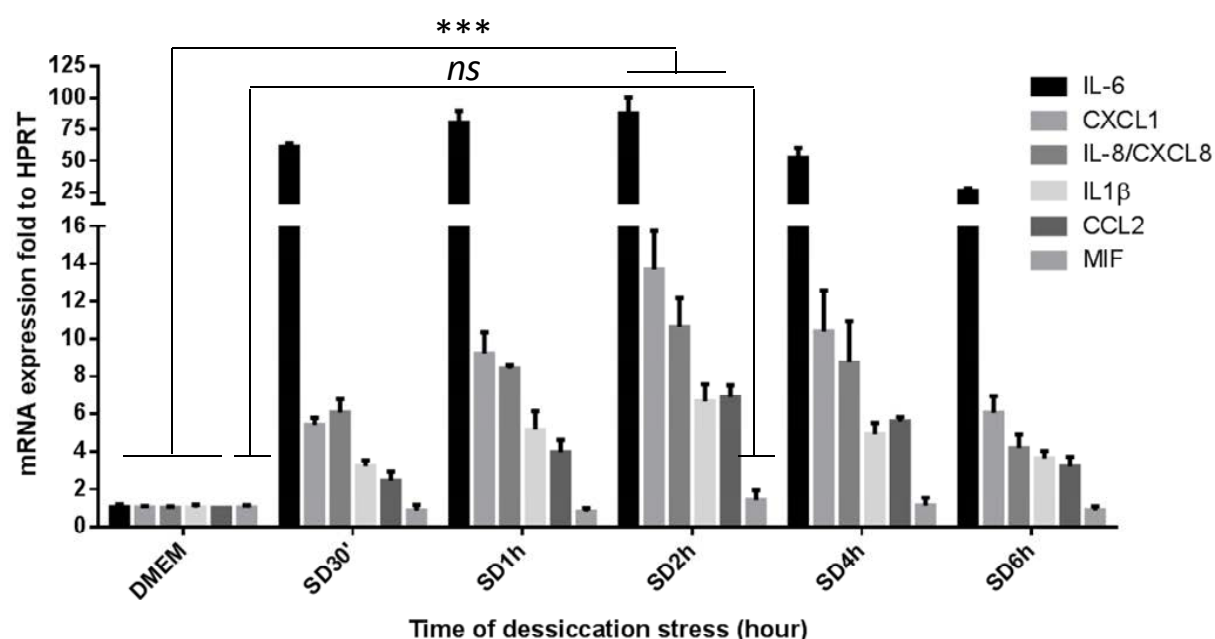


Figure 2. Synthèse d'ARNm par les HCE en réponse à la dessiccation et en fonction du temps. Quantification par RT-qPCR des ARNm codant pour les cytokines/chimiokines suivantes : IL-6, CXCL1, IL-8/CXCL8, IL1 β , CCL2 et MIF. La quantification est réalisée à chaque temps de dessiccation : 30min, 1h, 2h, 4h et 6h et les résultats sont rapportés à l'expression d'un gène de ménage HPRT. *** $P < 0,001$.

La cinétique de sécrétion protéique des HCE dans le surnageant a été évaluée par ELISA. Une accumulation progressive et plus importante que dans des conditions standards de culture a été observée en dessiccation pour chaque cytokine/chimiokine au cours du temps (Figure 3A). La superposition des courbes correspondant à la quantité de protéines retrouvés dans le surnageant au cours de la dessiccation montre une cinétique différente pour MIF qui atteint un niveau maximum après seulement 30 minutes versus 6h pour IL-6, CXCL1, IL-8/CXCL8 et CCL2. Indépendamment des conditions expérimentales, IL1 β n'est pas détectée dans le surnageant cellulaire.

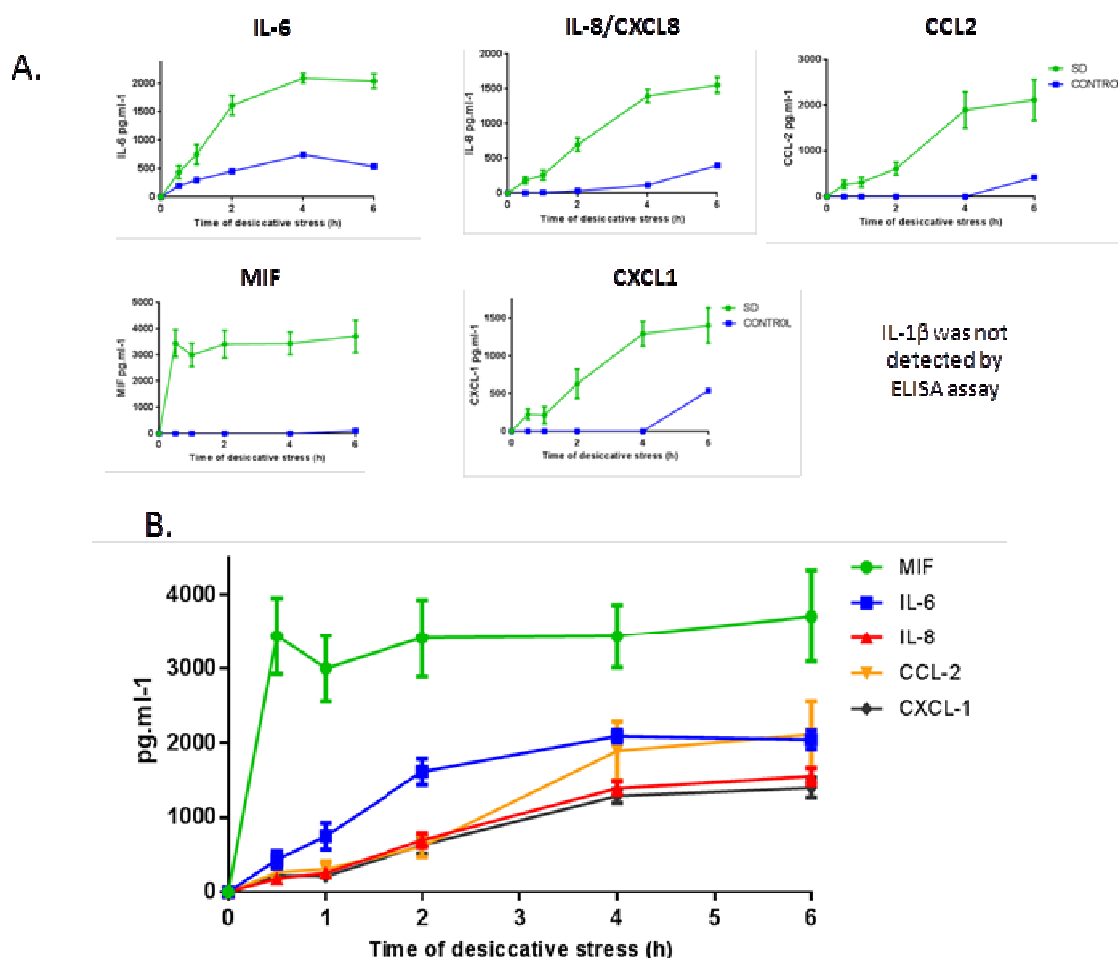


Figure 3: Concentrations des cytokines/chemokines dans le surnageant en fonction du temps de dessiccation. (A) la concentration des cytokines/chemokines: IL-6, CXCL1, IL-8/CXCL8, CCL2 et MIF a été déterminée dans le surnageant des HCE à chaque temps de dessiccation par ELISA. (B) Superposition de la cinétique de libération de chaque cytokines/chemokines en fonction du temps de dessiccation des HCE.

MIF est-il impliqué dans la synthèse des autres cytokines/chimiokines par les HCE au cours du SD? MIF est libéré plus rapidement dans le surnageant par une voie non conventionnelle de sécrétion protéique (Figure 3). Nous avons utilisé le modèle de SD pour tester l'effet d'un inhibiteur spécifique de MIF, ISO-1²²⁴, sur la synthèse des ARNm codant pour IL-6, CXCL1, IL-8/CXCL8, CCL2 and IL-1 β . Aucun effet significatif de ISO-1 n'est observé sur IL-6, CXCL1 et IL-8/CXCL8, cependant l'induction des ARNm codant pour CCL2 et IL-1 β induite par le SD est significativement inhibé par ISO-1 (Figure 4). Ces résultats sont observés à chaque temps du SD (résultats non montrés).

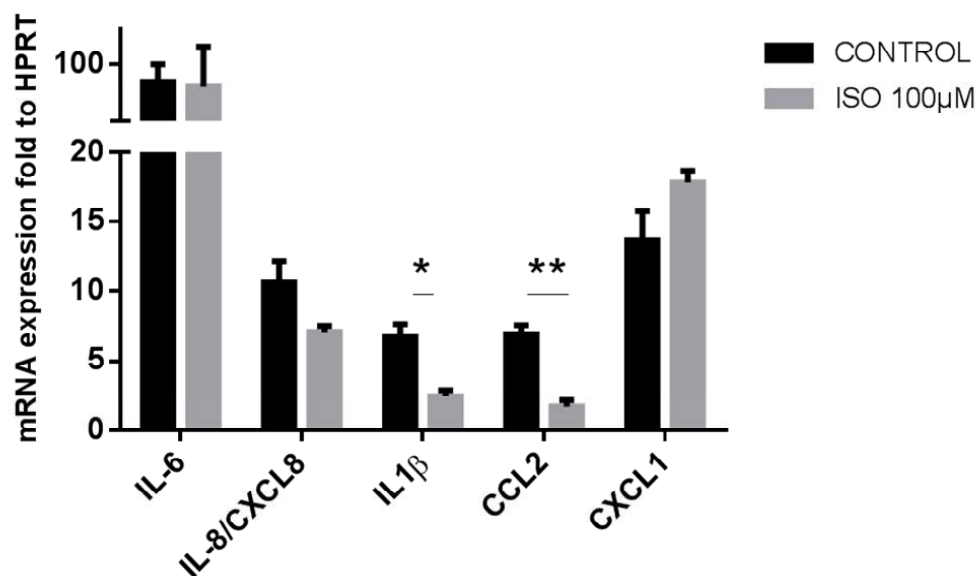


Figure 4: Exemple d'utilisation du model inflammatoire de SD sur les HCE avec un inhibiteur spécifique de MIF: Quantification par RT-qPCR des des ARNm codant pour IL-6, CXCL1, IL-8/CXCL8, CCL2 and IL-1 β après deux heures de SD +/- ISO-1 à 100µM. Les résultats sont rapportés à l'expression d'un gène de ménage HPRT. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

DISCUSSION

Le modèle développé de stress dessiccatif nous a permis de mettre en évidence le rôle proinflammatoire des cellules épithéliales de la SO. En effet, ce modèle mime le stress subi par les cellules épithéliales cornéenne et conjonctivale lorsque le film lacrymal ne protège plus la SO. Ce stress environnemental est capable de provoquer la synthèse et la libération de nombreuses cytokines/chimiokines proinflammatoires faisant de l'épithélium cornéen et conjonctival des portes d'entrées vers une inflammation chronique de la surface oculaire.

Ce modèle de dessiccation induit une augmentation importante de la production des ARNm codant pour certaines cytokines/chimiokines proinflammatoires telles que IL-6, IL-8/CXCL8, CXCL1, IL-1 β , MIF and CCL2. Cette augmentation est progressive en fonction du temps de dessiccation pour atteindre un maximum de production à 2h de SD. La libération de cytokines/chimiokines dans le milieu est corrélée à l'augmentation de la production d'ARNm pour IL-6, IL-8/CXCL8, CXCL1 et CCL2 mais pas pour MIF qui est retrouvé en grande quantité et très rapidement dans le milieu extracellulaire. En effet, MIF est une *chemokine-like fonction protein* (CLF) et, contrairement aux chimiokines, elle n'est pas synthétisée en réponse à un signal d'activation, mais elle constitutivement exprimée et contenue dans des vésicules intracellulaires de stockage et enfin est libérée en réponse à des stimulations et/ou des stress cellulaires²²⁵. La cinétique de sécrétion de MIF nous a conduit à évaluer son impact sur l'expression des autres cytokines/chimiokines libérées par les HCE au cours du SD. En utilisant un inhibiteur spécifique, nous avons pu mettre en évidence que MIF présente un rôle dans la synthèse de CCL2 et IL-1 β dans les cellules cornéennes. Il a déjà pu être mis en évidence, dans d'autres modèles inflammatoires, que MIF favorisait le recrutement de leucocytes au travers d'activation de voies impliquant CCL2²²⁶.

La compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la sécheresse oculaire avec un rôle centrale d'une inflammation chronique oriente la recherche vers des molécules anti-inflammatoires adaptées. Ce modèle *in vitro* de souffrance cellulaire devrait nous permettre d'identifier de nouveaux protagonistes inflammatoires, de comprendre les mécanismes d'actions de traitements déjà utilisés et de tester de nouvelles approches comme l'utilisation du sécrétome de CSMs pour ses propriétés anti-inflammatoire, cicatrisante et stimulatrice du recrutement des cellules souches endogènes.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les premiers essais cliniques utilisant les CSMs datent de plus de 15 ans. Leur efficacité et leur profil de sécurité les ont très rapidement projetées au stade clinique malgré une compréhension scientifique de leur rôle physiologique et des mécanismes thérapeutiques insuffisante. Alors qu'elles sont aujourd'hui largement utilisées à travers le monde, chez l'homme, et dans des domaines d'application variés, il subsiste encore aujourd'hui des questions sur leur réelle identité.

La définition de ce qui constitue une CSM est encore débattue aujourd'hui. En effet, le dogme qui postulait que les CSMs étaient des cellules principalement présentes dans la moelle osseuse et qui servaient de soutien à l'hématopoïèse a été bouleversé depuis longtemps. Des cellules, qui répondent aux caractéristiques de bases publiées par l'ISCT en 2006 pour identifier les CSMs, ont été isolées à partir de nombreux tissus différents¹⁹. Les premières furent mises en évidence dans le tissu adipeux²²⁷, ensuite vinrent celles du sang de cordon ombilical²²⁸ puis de la pulpe dentaire²²⁹ et finalement de presque tous les tissus vascularisés de l'organisme²¹. En effet, Crisan et al. ont apporté la confirmation que, s'il a été possible d'isoler des CSMs à partir de nombreux organes, c'est qu'elles sont périvasculaires. En effet, des cellules présentes sur la paroi des vaisseaux présentent des capacités d'autorenouvellement, de différenciation en cellules matures mésodermiques et expriment des marqueurs de CSMs. En outre, ces « CSMs périvasculaires » ont été retrouvées au stade fœtal et adulte suggérant une origine commune avec les péricytes²⁰. Les « CSMs périvasculaire » et les péricytes sont tous deux ubiquitaires et partagent l'expression de certains marqueurs comme CD146 par exemple, cependant le lien précis entre ces deux types cellulaires est encore discuté²³⁰. L'ensemble de ces découvertes sur la localisation *in vivo* des CSMs remet en question l'identité précise des CSMs^{20,23,95,230-232}.

Indépendamment de leur origine, les CSMs ont des propriétés et des phénotypes de base qui les rassemblent, cependant elles présentent également des différences. Les CSMs constituant donc une population cellulaire hétérogène, il semble donc nécessaire de donner des critères de caractérisation des cellules en fonction de leur origine. En outre, dans une démarche de comparaison des résultats apportés par les études précliniques et cliniques, il semble nécessaire de systématiquement préciser l'origine des cellules.

Il est très difficile aujourd'hui de donner des critères caractéristiques et communs aux CSMs. La grande variété de leur origine, le manque de compréhension de leur rôle physiologique *in*

vivo et l'absence de marqueur unique rend la tâche difficile. Il semble nécessaire de mettre au point des procédures standardisées de préparation des cellules en fonction des différents domaines d'application. L'ISCT propose ainsi des standards de préparation et de conditionnement des CSMs en vue d'une application immunomodulatrice²⁴. Dans une même démarche, Ranganath et al. ont réalisé une méta-analyse des études utilisant les CSMs dans les pathologies cardiovasculaires. Ils mettent ainsi en avant des facteurs importants du sécrétome des CSMs dans cette application et préconise des méthodes de conditionnement des cellules pour optimiser leurs effets¹¹³. L'objectif de ce travail est d'obtenir une « signature » protéomique ou sécrétomique des CSMs qui sont vouées à être utilisées en cardiologie.

Ces travaux posent les bases de ce qui devrait probablement s'étendre à chacun des domaines d'utilisation clinique des CSMs, l'objectif étant d'uniformiser les protocoles de préparation, de caractérisation phénotypique et fonctionnelle des CSMs en fonction des effets bénéfiques recherchés afin de pouvoir comparer les résultats d'études précliniques et cliniques.

Le développement d'un traitement est toujours confronté à une balance entre le bénéfice et le risque que celui-ci comporte. Une approche thérapeutique aussi efficace soit elle ne pourra jamais être transposée à l'homme si son utilisation fait prendre trop de risque au patient qui la reçoit. La thérapie cellulaire est évidemment confrontée à ces problèmes. Les cellules souches embryonnaires ont fait l'objet de nombreuses études de par leur plasticité importante et ont présenté un intérêt majeur en médecine régénérative notamment dans le traitement des pathologies hépatiques, neuronales ou encore cardiaques. Au-delà des problèmes éthiques liés à leur utilisation²³³, elles présentent un fort pouvoir mitogène et tumorigène. La formation de tératomes spontanés après injection intrapéritonéale de cellules souches embryonnaires chez la souris *nude* a été rapportée par Yamamoto et al.²³⁴. Bien que les cellules souches adultes aient un profil de sécurité beaucoup plus important que les cellules souches embryonnaires, elles présentent également des risques liés à leur nature et leur préparation.

Certaines études rétrospectives ont cherché à mettre en corrélation l'utilisation clinique de CSMs et la survenue d'effets indésirables. Indépendamment de l'origine des cellules utilisées (autologues ou allogéniques) et des protocoles de culture des cellules (sérum bovin ou humain), aucune corrélation n'a pu être mise en évidence sur 36 essais cliniques entre l'injection de CSMs et la survenue d'effets indésirables graves tels que la dysfonction d'organe, l'apparition d'événements infectieux, la mort ou encore la survenue de tumeurs. La

survenue de fièvre transitoire est l'unique effet indésirable corrélé avec un traitement à base de CSMs²³⁵.

Les protocoles de thérapie cellulaire utilisant les CSMs adultes prélevées chez le patient sont amplifiés *in vitro* avant d'être réimplantées. Ce passage des cellules en culture peut engendrer une population, même petite, de cellules sénescents qui progressivement deviennent tumorigènes et augmentent ainsi le risque de cancérisation *in vivo*. Les questions de stabilité génétique sont apparues avec quelques études montrant la transformation des CSMs en culture en cellules immortalisées^{236,237}. D'autres études, au contraire, ont démontré une grande stabilité chromosomique des CSMs *ex vivo*²³⁸. Les deux études de Rosland et al. et Rubio et al. ont cependant fait l'objet de rétractation ou correction car les cultures analysées étaient contaminées par des cellules tumorales²³⁹. Ben-David et al. ont analysé la fréquence et la nature de l'apparition d'aberrations chromosomiques chez les CSMs maintenues en culture²⁴⁰. Plus de 135 échantillons de CSMs humaines d'origine différente et provenant de 22 études cliniques ont ainsi été analysés. Ils concluent qu'il y a une probabilité de 4% d'acquisition par les CSMs d'une aberration chromosomique et qu'il est donc impératif d'analyser le profil génétique des cellules avant injection chez l'homme. La pertinence des protocoles utilisés, des résultats apportés et des conclusions avancées par cette étude sont débattus. Dans le cadre de l'ISCT, Sensébé et al. affirment, en s'appuyant sur de nombreuses études précliniques et en rappelant le recul de plus 400 essais cliniques, que les CSMs ne sont pas tumorigènes mais plutôt qu'elles entrent en sénescence avec ralentissement de leur prolifération *in vitro* pouvant être à l'origine d'une perte d'efficacité de la greffe, mais non à des mécanismes de tumorigénération^{241,242}.

Certains facteurs de risque ont été montrés comme favorisant la survenue de CSMs sénescents en culture. Certains domaines d'application des CSMs, en médecine régénérative pour les tissus ostéo-articulaire par exemple, requièrent une expansion rapide des cellules souvent sur des biomatériaux avant transplantation. La transfection des CSMs par des télomérases permet de potentialiser la prolifération des cellules et ainsi optimiser la réussite de la greffe. Cependant, il semblerait que ce type de transformation augmente le risque de transformation néoplasique des CSMs²⁴³.

Bien que les CSMs semblent pouvoir être utilisées en toute sécurité dans des conditions standards de culture, il apparaît aujourd'hui nécessaire de mieux comprendre ces mécanismes

de transformation des CSMs et de standardiser des outils de contrôles de la stabilité génétique de ces cellules.

Bien que de nombreux essais cliniques aient utilisé du sérum fœtal bovin (SFB) pour la préparation des CSMs à injecter, aucun effet secondaire majeur n'a été recensé. Cependant, il existe bien un risque de transmission de virus, de prions ou de protéines animales capables d'initier des réponses immunitaires chez l'hôte. Ce risque est d'autant plus grand lors d'injections répétées^{244,245}. Pour contourner ce problème, des sérums humains autologues (SA) ont été développés. La comparaison des CSMs cultivées avec du SFB ou du SA montre une plus grande stabilité et une vitesse de croissance plus importante des cellules en présence de SA versus SFB²⁴⁶. Les lysats plaquettaires semblent être les meilleurs candidats au remplacement des SFB, maintenant les propriétés fonctionnelles des CSMs, et notamment leur propriétés immunomodulatrices^{247,248}. Des données précliniques et cliniques doivent encore être accumulées avant de pouvoir conclure sur la sécurité de l'utilisation de lysats plaquettaires pour la culture des CSMs à des fins d'utilisation clinique.

De manière générale, la greffe pose la question du rejet immunitaire de l'élément greffé par l'organisme hôte. Au travers des nombreux essais cliniques utilisant la greffe de CSMs, il n'a pas été signalé d'événement majeur de rejet immunitaire. En effet, les CSMs sont fortement immunomodulatrices et sont principalement utilisées dans le cadre de greffes autologues. Cependant, à partir des années 2000, des études montrent l'efficacité des CSMs allogéniques à inhiber la prolifération des lymphocytes T *in vitro*²⁴⁹. De plus, les CSMs allogéniques semblent être efficace *in vivo* pour prolonger la survie de greffe de peau chez l'animal immunocompétent²⁵⁰ et ne semblent pas être rejeté par l'organisme hôte puisqu'elles sont retrouvées 13 mois après injection intrapéritonéale chez le mouton immunocompétent²⁵¹. Ces résultats suggèrent que les CSMs sont immunoprivilégiées et ouvrent la perspective de leur utilisation allogénique dans les études cliniques⁸⁷. De nombreuses études cliniques ont ainsi été menées en utilisant des CSMs allogéniques et avec le recul de ces travaux, il semble que leur utilisation n'induit pas de réaction immunitaire chez l'hôte. Cependant, plusieurs études mettent en avant un effet immunogène des CSMs allogéniques, certes moins important que d'autres types cellulaires tels que des fibroblastes ou des cellules hématopoïétiques mais toutefois réel. Les CSMs allogéniques persistent deux fois moins de temps que des CSMs syngéniques chez la souris immunocompétentes. De plus, une seconde injection des CSMs allogénique est rejetée plus rapidement et des cellules CD4+, CD122+, CD44+ et CD62 sont

retrouvées suggérant la formation de lymphocytes mémoires²⁵². Ainsi, les CSMs ne semblent pas immunoprivilégiés, toutefois leur rejet est moins rapide que pour d'autres types cellulaires. Ceci est probablement lié à un effet de balance entre leur faible immunogénicité et leur pouvoir immunorégulateur. Cette balance est probablement dépendante de l'environnement dans lequel les cellules sont injectées car il a été montré que le niveau d'expression des CMH et de leur protéines co-stimulatrices, faiblement exprimées à la surface des CSMs naïves, sont augmentées après exposition des cellules à l'IFN- γ ²⁵³.

La thérapie cellulaire utilisant les cellules souches mésenchymateuses n'a fait son apparition que récemment dans le monde de l'ophtalmologie. L'œil est un organe adapté pour les outils thérapeutiques tels que la thérapie génique et cellulaire. En effet, il est isolé et séparé de la circulation systémique par la barrière hémato-rétinienne (BHE). Cette barrière assure une protection vis-à-vis du passage des éléments injectés dans le sang circulant. De plus, elle confère un privilège immunitaire à l'œil en limitant le recrutement des cellules immunes²⁵⁴ et donc en le protégeant des réponses immunitaires consécutives à l'injection d'éléments étrangers.

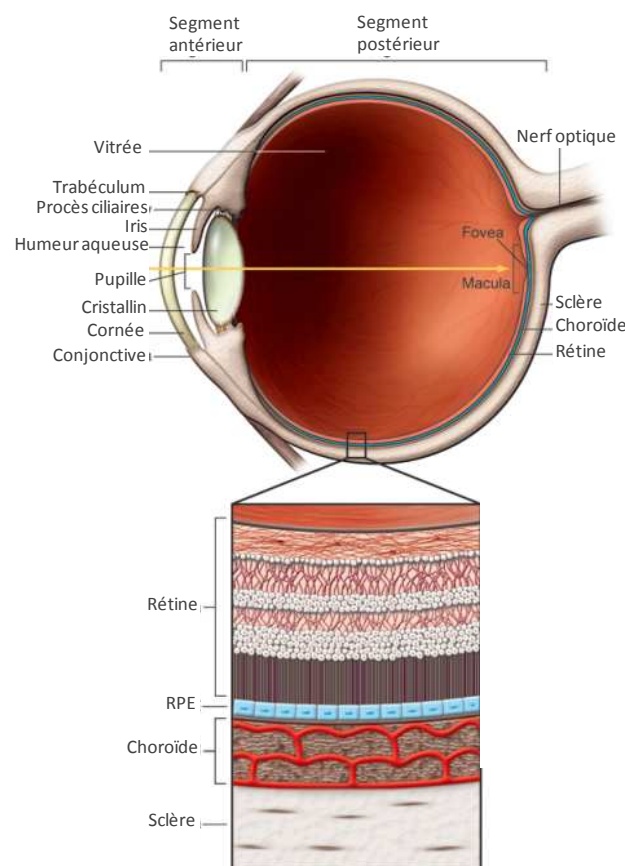


Figure 28 : Schéma anatomique de l'œil²⁵⁴

La taille et la compartimentalisation de l'œil, chambre antérieure, vitrée, espace rétinien ou sous-rétinien, permettent de restreindre la quantité de cellules à injecter et de cibler partiellement certains tissus. De plus, sa transparence et le développement d'outils d'imagerie de pointe permettent de suivre *in vivo* la dispersion des cellules injectées.

Le glaucome à angle ouvert est une neuropathie optique qui associe dans la grande majorité des cas une dégénérescence des CGRs et une dégénérescence du trabéculum. La mort progressive des cellules trabéculaires et le remodelage du tissu avec une accumulation de matrice extracellulaire est à l'origine de l'augmentation de la PIO. L'augmentation de la PIO est le facteur de risque le plus important induisant la mort des cellules ganglionnaires de la rétine.

Aujourd'hui, les traitements de la prise en charge du glaucome visent à diminuer la PIO en favorisant des voies alternatives d'écoulement de l'humeur aqueuse (HA) (voie uvéo-sclérale), en diminuant la production d'HA par les procès ciliaires ou chirurgicalement en supprimant partiellement le trabéculum plus fonctionnel et donc plus capable de drainer l'HA présente dans la chambre antérieure et finalement devenant un obstacle à son écoulement vers le canal de Schlemm. Cependant, aucune approche thérapeutique à l'heure actuelle ne vise à atténuer/ralentir/limiter la dégénérescence du trabéculum afin de restaurer sa fonction.

La rationalité d'utiliser les CSMs dans le traitement du glaucome vient de la physiopathologie de la maladie. En effet, comme décrit dans l'introduction générale, les CSMs produisent beaucoup de facteurs ayant des effets bénéfiques sur l'homéostasie des tissus, mais également sur leur réparation. Elles ont été décrites comme présentant à la fois des propriétés neuroprotectrices et antifibrotiques au travers de leur activité paracrine. Par conséquent, dans la physiopathologie glaucomateuse, les CSMs pourraient présenter un intérêt à la fois sur la protection du trabéculum et sur celle des cellules ganglionnaires de la rétine. De plus, comme énoncé précédemment, la localisation périvasculaire et stromale des CSMs ainsi que leur capacité à se différencier en cellules du tissu conjonctif suggèrent un rôle de maintien dans l'homéostasie des tissus et une réserve en cellules progénitrices. Ce rôle semble également vrai pour le trabéculum puisque Tay et al. ont récemment caractérisé des CSMs à partir du trabéculum²⁷.

Les premières études qui se sont intéressées à l'intérêt potentiel des CSMs dans le glaucome ont recherché leurs effets neuroprotecteurs appliqué au glaucome et à la dégénérescence des CGRs^{135,184,190,191}. Les CSMs semblent bien inhiber la mort des CGRs dans différents modèles

animaux de glaucome par injection intravitréenne. Cependant une seule étude publiée en 2013 a montré que les CSMs pouvaient également présenter des effets bénéfiques sur le trabéculum⁷⁴.

Le but de notre étude, dans un premier temps, a été de confirmer les résultats de Manuguerra et al. sur l'effet des CSMs sur la régulation de la PIO dans un autre modèle d'hypertension oculaire. Nous avons utilisé un modèle de glaucome par hypertension oculaire en cautérisant 3 veines épisclérales sur 4. Ce modèle présente l'avantage d'être faiblement inflammatoire et d'induire une mort progressive des cellules trabéculaires conduisant à une destruction du tissu secondaire à l'augmentation de la PIO. Nous montrons, qu'en parallèle de l'augmentation de la PIO, nous observons une augmentation de la concentration en TGF- β 2 dans l'HA des yeux hypertendus, et nous confirmons que ce modèle induit bien une dégénérescence des CGRs en périphérie de la rétine. Un modèle expérimental est, par définition, imparfait, toutefois celui-ci semble reproduire les caractéristiques majeures de la pathologie glaucomateuse²⁵⁵. Manuguerra et al. ont également utilisé un modèle d'hypertension oculaire par destruction du trabéculum au laser sur 180°. Ce modèle est efficace pour induire une augmentation de la PIO intraoculaire mais détruit de manière totale et aiguë la moitié du trabéculum et induit une inflammation très importante dans la chambre antérieure.

Le compartiment d'injection des CSMs va conditionner l'effet recherché. L'approche thérapeutique que nous recherchions est un effet des CSMs sur le trabéculum. Par conséquent, l'injection des cellules dans la chambre antérieure a semblé la meilleure option. L'HA étant peu visqueuse, la dispersion des cellules fut optimale dans l'ensemble de la chambre antérieure. Sur les coupes transverses des yeux injectés, les cellules ont été retrouvées dispersées autour de l'angle irido-cornéen, collées sur l'iris et sur l'endothélium cornéen et également dans le trabéculum. De manière surprenante, des CSMs ont également été retrouvées au niveau des procès ciliaires. Cette localisation peut être due à un passage des cellules au moment de l'injection sous l'iris ou bien à une migration cellulaire vers les procès ciliaires qui produisent un grand nombre de chimiokines. Nous montrons que l'injection des CSMs en chambre antérieure protège les cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs) en périphérie. Cette protection peut être à la fois due à la baisse de PIO induite par l'effet protecteur du sécrétome des CSMs, mais également à l'effet trophique direct du sécrétome des CSMs greffées au niveau des procès ciliaire sur les CGRs périphériques qui sont anatomiquement très proche. Des travaux ont montré que le muscle ciliaire constituait un site privilégié pour la délivrance de principes actifs car c'est le seul tissu dont les facteurs produits

vont diffuser à la fois dans la chambre antérieure et dans la chambre postérieure de l'œil²⁵⁶. L'injection des CSMs au niveau des procès ciliaires pourrait alors constituer une perspective intéressante²⁵⁷.

Les résultats expérimentaux montrent un effet transitoire de la greffe des CSMs sur la PIO. Après 15 jours de diminution significative de la PIO, l'effet s'estompe bien que les cellules injectées soient toujours présentes, incorporées autour de l'angle irido-cornéen. Nous avons émis l'hypothèse que les CSMs se transdifférenciaient progressivement en fonction des messages qu'elles reçoivent du tissu hôte modifiant ainsi la nature de leur sécrétome. Cette observation a déjà été faite sur l'activité immunomodulatrice des CSMs. Lorsqu'elles se différencient elles deviennent alors moins efficaces pour inhiber la prolifération des lymphocytes T et des cellules NK²⁵⁸. Certaines cytokines proinflammatoires, telles que Il-1 sont capables d'inhiber la différenciation des CSMs en chondrocytes^{259,260}. De plus, Yu et al. sont parvenus à identifier une protéine de surface, CD49f, impliquée dans la régulation de la différenciation et dans le maintien de la pluripotence des CSMs²⁶¹. Dans la perspective d'une transposition clinique, il est essentiel d'optimiser les effets des CSMs dans le temps afin de diminuer la fréquence d'injection des cellules. La compréhension des mécanismes de régulation de la différenciation des CSMs pourrait permettre d'augmenter les effets dans le temps de l'injection des cellules.

L'injection intravitréenne des CSMs semble bien préserver la survie des CGRs de la mort dans différents modèles de glaucome. Certaines études se sont attachées à identifier un facteur trophique neuroprotecteur du sécrétome des CSMs tel que le BDNF¹⁸⁴ ou le PDGF¹³⁶ majoritairement responsable des effets observés. Cette approche est essentielle lorsque les études ciblent un effet paracrine des CSMs⁹⁵. Le développement de modèles *in vitro* de survie et de croissance dans des cultures purifiées de CGRs sont des approches intéressantes pour identifier des facteurs ayant une action prépondérante *in vivo*²⁴⁵. De la même manière, l'analyse du sécrétome des CSMs et le développement d'outils *in vitro*, au travers de matrices en 3 dimensions notamment, pourraient permettre d'identifier les facteurs ayant des effets bénéfiques sur la survie et la contractibilité des cellules trabéculaires²⁶³. Toutefois, Il est évident que l'effet protecteur des CSMs sur le tissu cible vient à la fois d'un effet direct et d'un effet indirect en agissant sur le microenvironnement cellulaire et tissulaire (inflammation, néoangiogenèse ou encore sur le remodelage de la ECM)^{120,121}.

Dans la perspective de la mise en place d'un essai clinique de tolérance chez l'homme, plusieurs études précliniques sont nécessaires. L'agence européenne de santé (EMA) propose ainsi des lignes directrices pour la gestion des risques liés à l'utilisation de thérapies innovantes et de produits du corps humain ou d'*Advanced Therapy Medicinal Product* (ATMP) en clinique. Les protocoles de gestion de ces risques sont inhérents à l'ATMP concerné et font référence à son efficacité, à sa qualité et à sa sécurité²⁶⁴. L'efficacité fait référence aux études précliniques montrant un effet bénéfique de l'injection intracaméculaire des CSMs dans des modèles de glaucome⁷⁴. La qualité se rapporte à l'accréditation des organismes pour la préparation des CSMs pour un usage clinique et l'application des bonnes pratiques de fabrication (*Good Manufacturing Practices* -GMP). Enfin, la sécurité se rapporte aux études précliniques nécessaires afin d'évaluer les risques de l'injection intracaméculaire des CSMs en fonction des risques qui sont connus ou potentiels à l'utilisation de ces cellules.

Certains effets indésirables ont été rapportés suite à l'utilisation des CSMs dans des études précliniques. En outre, certains travaux ont mis en évidence que les CSMs étaient capables, *in vitro*, de conférer un phénotype « activé » à des cellules tumorales²⁶⁵ et également de favoriser, *in vivo*, la croissance de tumeurs préexistantes notamment au travers de leur pouvoir immunomodulateur^{265,266}. Par conséquent, il est nécessaire de réaliser des études de doses et de biodistribution des cellules chez l'hôte afin de s'assurer que les cellules injectées ne vont pas être recrutées dans des zones anatomiques non souhaitées.

Le choix d'un système de marquage des cellules est indispensable à l'étude de la biodistribution. Il doit être spécifique des cellules injectées, être stable et être transmissible aux cellules filles. Il existe des colorants extracellulaires (5-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (BrdU))²⁶⁷ ou des gènes marqueurs (GFP)²⁶⁸ qui vont permettre de retrouver les cellules dans les tissus après sacrifice. D'autres systèmes de radiomarquage²⁶⁹, de transfection des CSMs avec la luciférase²⁷⁰ ou encore d'incorporation de nanoparticules magnétiques permettent le suivi des cellules *in vivo* au cours du temps mais semblent moins sensibles²⁷¹. La recherche de la biodistribution des CSMs dans le tissu peut être réalisée via la détection par qPCR ou histologique d'une séquence génique fortement répétée chez les CSMs humaines²⁷². Cependant, cette technique requiert l'utilisation xénogénique de CSMs humaines chez une autre espèce.

Dans un premier temps, il serait intéressant d'étudier la distribution des CSMs de lapin marquées avec un système sensible de détection (BrdU) et injectées en intracaméculaire dans

des yeux de lapins naïfs en testant différentes concentrations de cellules. En effet, le lapin est un bon modèle car l'anatomie de son œil est proche de celle de l'Homme, bien que présentant des dimensions différentes.

Le modèle de glaucome utilisé étant uniquement développé chez le rat et l'étude de la biodistribution des CSMs humaines étant souvent requise, il serait intéressant d'étudier la distribution de CSMs humaines chez des rats naïfs et glaucomateux sous traitement immunosuppresseurs (Ciclosporine). Des qPCR des différents tissus afin de rechercher l'expression de la séquence Alu chez les CSMs humaines permettrait de déterminer s'il y a un risque de passage des CSMs dans la circulation systémique.

CONCLUSION

Les CSMs associent deux critères majeurs pour le développement d'un traitement, efficacité et sécurité. Ces qualités ont cependant été à l'origine de leurs défauts. La transposition à l'homme des protocoles d'utilisation des CSMs a souvent été rapide en dépit de la compréhension totale des mécanismes impliqués. Phinney et al. reconnaissent, dans une lettre de réponse à l'article de Bianco et al. remettant en question l'utilisation des CSMs en clinique²¹⁹, que certaines allégations des effets des CSMs sont exagérées²⁶². Bianco et al. affirment que le seul véritable intérêt des CSMs est leur propriété de progéniteurs des tissus squelettiques et que pour régénérer les tissus nerveux ou cardiaques, il est préférable d'utiliser des cellules souches/progénitrices des tissus ciblés. La pluripotence des CSMs pour régénérer des tissus autres que les tissus squelettiques n'a jamais abouti à des résultats convaincants malgré la multiplication d'essais cliniques²¹⁹. En effet, cette capacité des CSMs à se différencier en un grand nombre de cellules spécialisées différentes pose des questions et est sujette à de nombreuses polémiques. Cependant, Phinney²⁶² et Fibbes²⁶³ dans leur réponse respective rappellent que, bien que certaines propriétés des CSMs requièrent encore des validations, d'autres ont fait leurs preuves, notamment l'activité paracrine des CSMs au travers de la production de molécules ayant des effets trophiques reconnues ou encore des molécules identifiées comme interagissant avec les cellules immunitaires. Ces propriétés sont à l'origine d'études de phase I et II dans la prise en charge des GvHD^{84,92} résistant aux corticoïdes, l'ischémie sévère des membres⁶¹ ou encore le lupus érythémateux²⁶⁴. Bianco reconnaît cette efficacité mais rappelle que certes, quelques essais cliniques ont bien montré des résultats prometteurs mais de nombreux autres ne concluent pas favorablement²⁶⁵. En effet, Fibbes et al. mettent en avant l'importance de la pertinence des critères de jugement utilisés au court de la mise en place des essais cliniques utilisant les CSMs nécessitant l'association de biomarqueurs aux paramètres cliniques des pathologies. Il serait cependant dommage de nier l'efficacité d'un outil thérapeutique tel que la thérapie cellulaire utilisant les CSMs sous prétexte de fonctions biologiques encore incomplètement comprises²⁶³.

L'utilisation de la thérapie cellulaire utilisant les CSMs en ophtalmologie arrive tard par rapport à d'autres disciplines telles que la cardiologie, le diabète ou le GvHD alors que l'œil reste un organe particulièrement bien adapté à ce type de thérapie²⁶⁶. Ce retard nous permet d'avoir du recul et de bénéficier de la mise en place de protocoles optimisés pour la préparation des CSMs pour une utilisation donnée^{21,82,109}.

RÉFÉRENCES

1. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 1957;257(11):491–6.
2. Zipori D. The nature of stem cells: state rather than entity. *Nat Rev Genet*. 2004.
3. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663–76.
4. Alt EU, Senst C, Murthy SN, et al. Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties. *Stem Cell Res*. 2012;8(2):215–25.
5. Friedenstein a. J, Chailakhjan RK, Lalykina KS. the Development of Fibroblast Colonies in Monolayer Cultures of Guinea-Pig Bone Marrow and Spleen Cells. *Cell Prolif*. 1970;3(4):393–403.
6. Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci*. 1988.
7. Caplan A. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;20:5–14.
8. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*. 1997;64(2):278–94.
9. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007;131(2):324–36.
10. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human Mesenchymal Stem Cells. *Science*. 1999;284(5411):143–147.
11. Qian H, Yang H, Xu W, Yan Y. Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate rat acute renal failure by differentiation into renal tubular epithelial-like cells. *Int J Mol Med* 2008;(14):325–332.
12. Khoo MLM, Shen B, Tao H, Ma DDF. Long-term serial passage and neuronal differentiation capability of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008;17(5):883–96.
13. Campard D, Lysy P a, Najimi M, Sokal EM. Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. *Gastroenterology*. 2008;134(3):833–48.
14. Takashima Y, Era T, Nakao K, et al. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell*. 2007;129(7):1377–88.
15. Isern J, García-García A, Martín AM, et al. The neural crest is a source of mesenchymal stem cells with specialized hematopoietic stem cell niche function. *Elife*. 2014;3:1–28.

16. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(9):726–36.
17. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 2006;24(5):1294–301.
18. Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(5):383–96.
19. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315–7.
20. Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008;3(3):301–13.
21. Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006;119(1):2204–13.
22. Covas DT, Panepucci R a, Fontes AM, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol.* 2008;36(5):642–54.
23. Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell.* 2008;3(3):229–30.
24. Krampera M, Galipeau J, Shi Y, Tarte K, Sensebe L. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy.* 2013;15(9):1054–61.
25. Rossignoli F, Caselli A, Grisendi G, et al. Isolation, characterization, and transduction of endometrial decidual tissue multipotent mesenchymal stromal/stem cells from menstrual blood. *Biomed Res Int.* 2013;2013:901821.
26. Davies OG, Cooper PR, Shelton RM, Smith a J, Scheven B a. A comparison of the in vitro mineralisation and dentinogenic potential of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Metab.* 2014.
27. Tay CY, Sathiyathan P, Chu SWL, Stanton LW, Wong TT. Identification and characterization of mesenchymal stem cells derived from the trabecular meshwork of the human eye. *Stem Cells Dev.* 2012;21(9):1381–90.
28. Bray LJ, Heazlewood CF, Munster DJ, Hutmacher DW, Atkinson K, Harkin DG. Immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cell cultures derived from the limbus of human and rabbit corneas. *Cytotherapy.* 2014;16(1):64–73.
29. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(1):11–21.

30. Katayama Y, Battista M, Kao W-M, et al. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*. 2006;124(2):407–21.
31. Bennett JH, Joyner CJ, Triffitt JT, Owen ME. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci*. 1991.
32. Takizawa H, Boettcher S, Manz MG. Demand-adapted regulation of early hematopoiesis in infection and inflammation. *Blood*. 2012;119(13):2991–3002.
33. Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(4):290–301.
34. Adams GB, Scadden DT. The hematopoietic stem cell in its place. *Nat Immunol*. 2006;7(4):333–7.
35. York N. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829–834.
36. Schürch CM, Riether C, Ochsenbein AF. Cytotoxic CD8+ T cells stimulate hematopoietic progenitors by promoting cytokine release from bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cell Stem Cell*. 2014;14(4):460–72.
37. Pamer CS and EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11(11): 762–774.
38. Shi C, Jia T, Mendez-ferrer S, et al. Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating Toll-like receptor ligands. *Immunity*. 2012;34(4):590–601.
39. Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004;118(2):149–61.
40. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 1996.
41. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006;25(6):977–88.
42. Greenbaum A, Hsu Y-MS, Day RB, G., Laura Schuettepelz M, J. Christopher, Joshua N. Borgerding, Takashi Nagasawa and DCL. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature*. 2013;495(7440):227–230.
43. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014;505(7483):327–34.

44. Charbord P, Pouget C, Binder H, et al. A Systems Biology Approach for Defining the Molecular Framework of the Hematopoietic Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell*. 2014;376–391.
45. Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*. 2008;3(4):e1886.
46. Mantovani A. MSCs, macrophages, and cancer: a dangerous ménage-à-trois. *Cell Stem Cell*. 2012;11(6):730–2.
47. Mei SHJ, Haitsma JJ, Dos Santos CC, et al. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(8):1047–57.
48. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2—dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*. 2009;15(1):42–49.
49. DelaRosa O, Lombardo E. Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:865601.
50. Ren G, Zhang L, Zhao X, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008;2(2):141–50.
51. Shi Y, Su J, Roberts A, Shou P. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol*. 2012;33(3):136–143.
52. Quarto, Mastrogiacomo, Cancedda, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *New Engl J Med*. 2001;344(5):381–387.
53. Lawrence B, Madhally S. Cell colonization in degradable 3D porous matrices. *Cell Adh Migr*. 2008;3(3):9–16.
54. Wakitani S, Mitsuoka T, Nakamura N, Toritsuka Y, Nakamura Y, Horibe S. Autologous Bone Marrow Stromal Cell Transplantation for Repair of Full-Thickness Articular Cartilage Defects in Human Patellae: Two Case Reports. *Cell Transplant*. 2004;13(5):595–600.
55. Planat-Benard V, Silvestre J-S, Cousin B, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004;109(5):656–63.
56. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*. 2004;94(5):678–85.

57. Hung S-C, Pochampally RR, Chen S-C, Hsu S-C, Prockop DJ. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells*. 2007;25(9):2363–70.
58. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*. 2007;25(10):2648–59.
59. Boomsma R a, Geenen DL. Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis. *PLoS One*. 2012;7(4):e35685.
60. Estrada R, Li NA, Sarojini H, An JIN, Lee M, Wang E. Secretome From Mesenchymal Stem Cells Induces Angiogenesis Via Cyr61. *J Cell Physiol*. 2010;219(3):563–571.
61. Takahashi M, Suzuki E, Oba S, et al. Adipose tissue-derived stem cells inhibit neointimal formation in a paracrine fashion in rat femoral artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298(2):H415–23.
62. Caplan AI, D C. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*. 2012;9(1):11–15.
63. Alfarano C, Roubex C, Chaaya R, et al. Intraparenchymal injection of bone marrow mesenchymal stem cells reduces kidney fibrosis after ischemia-reperfusion in cyclosporine-immunosuppressed rats. *Cell Transplant*. 2012;21(9):2009–19.
64. Mias C, Lairez O, Trouche E, Roncalli J. Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction. *Stem Cells*. 2009:2734–2743.
65. Bura A, Planat-Benard V, Bourin P, et al. Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytotherapy*. 2014;16(2):245–57.
66. Semberger S, Jamnig A, Stefanova N, Lepperdinger G, Reindl M, Wenning GK. Mesenchymal stem cells in a transgenic mouse model of multiple system atrophy: immunomodulation and neuroprotection. *PLoS One*. 2011;6(5):e19808..
67. Mora-Lee S, Sirerol-Piquer MS, Gutiérrez-Pérez M, et al. Therapeutic effects of hMAPC and hMSC transplantation after stroke in mice. *PLoS One*. 2012;7(8):e43683.
68. Kopen G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;(96):10711–10716.
69. Liu J, Song L, Jiang C, Liu Y. Electrophysiological properties and synaptic function of mesenchymal stem cells during neurogenic differentiation-a mini-review. *Int J Artif Organs*. 2012;35(5):323–37
70. Giunti D, Parodi B, Usai C, et al. Mesenchymal stem cells shape microglia effector functions through the release of CX3CL1. *Stem Cells*. 2012;30(9):2044–53.

71. Isele NB, Lee H-S, Landshamer S, et al. Bone marrow stromal cells mediate protection through stimulation of PI3-K/Akt and MAPK signaling in neurons. *Neurochem Int.* 2007;50(1):243–50.
72. Rosova I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolta J. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008;26(8):2173–2182.
73. Canals JM, Pineda JR, Torres-Peraza JF, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington’s disease. *J Neurosci.* 2004;24(35):7727–39.
74. Manuguerra-Gagné R, Boulos PR, Ammar A, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes tissue regeneration in a glaucoma model through laser-induced paracrine factor secretion and progenitor cell recruitment. *Stem Cells.* 2013;31(6):1136–48.
75. Dong F, Harvey J, Finan A, Weber K, Agarwal U, Penn MS. Myocardial CXCR4 expression is required for mesenchymal stem cell mediated repair following acute myocardial infarction. *Circulation.* 2012;126(3):314–24.
76. Yoo S-W, Kim S-S, Lee S-Y, et al. Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model. *Exp Mol Med.* 2008;40(4):387–97.
77. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood.* 2004;103(12):4619–21.
78. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005;105(4):1815–22..
79. Choi H, Lee RH, Bazhanov N, Oh JY, Prockop DJ. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- κ B signaling in resident macrophages. *Blood.* 2011;118(2):330–8.
80. Di Nicola M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002;99(10):3838–3843.
81. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006;24(2):386–98.
82. Krampera M. Mesenchymal stromal cell “licensing”: a multistep process. *Leukemia.* 2011;25(9):1408–14.
83. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One.* 2010;5(4):e10088.

84. Chan JL, Tang KC, Patel AP, et al. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood*. 2006;107(12):4817–24.
85. Ramasamy R, Tong CK, Seow HF, Vidyadaran S, Dazzi F. The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. *Cell Immunol*. 2008;251(2):131–6.
86. Menard C, Pacelli L, Bassi G, et al. Clinical-grade mesenchymal stromal cells produced under various good manufacturing practice processes differ in their immunomodulatory properties: standardization of immune quality controls. *Stem Cells Dev*. 2013;22(12):1789–801.
87. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004;363(9419):1439–41.
88. Blanc K Le, Frassoni F, Ball L, Locatelli F. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;1579–1586.
89. Yañez R, Lamana ML, García-Castro J, Colmenero I, Ramírez M, Bueren J a. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells*. 2006;24(11):2582–91.
90. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, et al. Multiple infusions of mesenchymal stromal cells induce sustained remission in children with steroid-refractory, grade III–IV acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2013;163(4):501–9.
91. Xu J, Wang D, Liu D, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell treatment alleviates experimental and clinical Sjögren syndrome. *Blood*. 2012;120(15):3142–51.
92. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*. 2005;106(5):1755–61.
93. Nemoto Y, Kanai T, Takahara M, et al. Bone marrow-mesenchymal stem cells are a major source of interleukin-7 and sustain colitis by forming the niche for colitogenic CD4 memory T cells. *Gut*. 2013;62(8):1142–52.
94. Dalal J, Gandy K, Domen J. Role of mesenchymal stem cell therapy in Crohn's disease. *Pediatr Res*. 2012;71(4 Pt 2):445–51.
95. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell*. 2012;10(6):709–16.
96. Ball L, Bernardo M. Multiple infusions of mesenchymal stromal cells induce sustained remission in children with steroid-refractory, grade III–IV acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2013; 163(4):501–9.

97. Trapani I, Puppo A, Auricchio A. Vector platforms for gene therapy of inherited retinopathies. *Prog Retin Eye Res.* 2014.
98. Lazarus H, Haynesworth S. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant.* 1995.
99. Pearson RA. Restoration of vision after transplantation of photoreceptors. *Nature.* 2012;485(7396):99–103.
100. Jiang J, Lv Z, Gu Y, et al. Adult rat mesenchymal stem cells differentiate into neuronal-like phenotype and express a variety of neuro-regulatory molecules in vitro. *Neurosci Res.* 2010;66(1):46–52.
101. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000;61(4):364–70.
102. Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest.* 2004;113(12):1701–1710.
103. Bae J-S, Han HS, Youn D-H, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote neuronal networks with functional synaptic transmission after transplantation into mice with neurodegeneration. *Stem Cells.* 2007;25(5):1307–16.
104. Ng TK, Fortino VR, Pelaez D, Cheung HS. Progress of mesenchymal stem cell therapy for neural and retinal diseases. *World J Stem Cells.* 2014;6(2):111–9.
105. Nadri S, Yazdani S, Arefian E, et al. Mesenchymal stem cells from trabecular meshwork become photoreceptor-like cells on amniotic membrane. *Neurosci Lett.* 2013;541:43–8.
106. Huo D-M, Dong F-T, Yu W-H, Gao F. Differentiation of mesenchymal stem cell in the microenvironment of retinitis pigmentosa. *Int J Ophthalmol.* 2010;3(3):216–9.
107. Scuteri A, Miloso M, Foudah D, Orciani M, Cavaletti G, Tredici G. Mesenchymal Stem Cells Neuronal Differentiation Ability: A Real Perspective for Nervous System Repair? *Curr Stem Cell Res Ther.* 2011;6(2):82–92.
108. Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: Switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells.* 2005;392–402.
109. Castanheira P, Torquetti L. Retinal incorporation and differentiation of mesenchymal stem cells intravitreally injected in the injured retina of rats. *Arq Bras.* 2008;71(1):644–650.
110. Li N, Li X, Yuan J. Effects of bone-marrow mesenchymal stem cells transplanted into vitreous cavity of rat injured by ischemia/reperfusion.. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2008;247(4):503-14.

111. Przyborski S, Hardy S, Maltman D. Mesenchymal Stem Cells as Mediators of Neural Differentiation. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2008;3(1):43–52.
112. Meirelles LDS, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(5-6):419–27.
113. Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, Karp JM. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell.* 2012;10(3):244–58.
114. Paul G, Anisimov S V. The secretome of mesenchymal stem cells: Potential implications for neuroregeneration. *Biochimie.* 2013;(7):1–11.
115. Chen J, Chopp M. Neurorestorative treatment of stroke: cell and pharmacological approaches. *NeuroRx.* 2006;3(4):466–73.
116. Castillo-Melendez M, Yawno T, Jenkin G, Miller SL. Stem cell therapy to protect and repair the developing brain: a review of mechanisms of action of cord blood and amnion epithelial derived cells. *Front Neurosci.* 2013;7(10):194.
117. Arnhold S, Absenger Y, Klein H, Addicks K, Schraermeyer U. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue photoreceptor cells in the dystrophic retina of the rhodopsin knockout mouse. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007;245(3):414–22.
118. Wang S, Lu B, Girman S, et al. Non-invasive stem cell therapy in a rat model for retinal degeneration and vascular pathology. *PLoS One.* 2010;5(2):e9200.
119. Guan Y, Cui L, Qu Z, Lu L, Wang F. Subretinal transplantation of rat MSCs and erythropoietin gene modified rat MSCs for protecting and rescuing degenerative retina in rats. *Curr Mol Med.* 2013;13(9):1419–31.
120. Aizman I, Tate CC, McGrogan M, Case CC. Extracellular matrix produced by bone marrow stromal cells and by their derivative, SB623 cells, supports neural cell growth. *J Neurosci Res.* 2009;87(14):3198–206.
121. Kerever A, Schnack J, Vellinga D, et al. Novel extracellular matrix structures in the neural stem cell niche capture the neurogenic factor fibroblast growth factor 2 from the extracellular milieu. *Stem Cells.* 2007;25(9):2146–57.
122. Nduaguba C, Lee RK. Glaucoma screening: current trends, economic issues, technology, and challenges. *Curr Opin Ophthalmol.* 2006;17(2):142–52.
123. Mansberger SL, Cioffi G a. The probability of glaucoma from ocular hypertension determined by ophthalmologists in comparison to a risk calculator. *J Glaucoma.* 2006;15(5):426–31.
124. Mackenzie P, Cioffi G. How does lowering of intraocular pressure protect the optic nerve? *Surv Ophthalmol.* 2008;53 Suppl1:S39–43.

125. Hernandez MR. The optic nerve head in glaucoma: role of astrocytes in tissue remodeling. *Prog Retin Eye Res.* 2000;19(3):297–321.
126. Alward WL, Krachmer, J.S. (éd.), Glaucoma. Mosby S-L. *The requisites in ophthalmology.*; 2000:10–14.
127. Rohen JW, Lütjen-Drecoll E, Flügel C, Meyer M, Grierson I. Ultrastructure of the Trabecular Meshwork 10in Untreated Cases of Primary Open-Angle Glaucoma (POAG). *Exp Eye Res.* 1993;56(6):683–692.
128. Hosseini M, Rose AY, Song K, et al. IL-1 and TNF induction of matrix metalloproteinase-3 by c-Jun N-terminal kinase in trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(4):1469–76.
129. Acott TS. Extracellular matrix in the trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 2008;86(4):543–561.
130. Andrews EM, Tsai S-Y, Johnson SC. Human adult bone marrow-derived somatic cell therapy results in functional recovery and axonal plasticity following stroke in the rat. *Exp Neurol.* 2008;211(2):588–592.
131. Kim Y-J, Park H-J, Lee G, et al. Neuroprotective effects of human mesenchymal stem cells on dopaminergic neurons through anti-inflammatory action. *Glia.* 2009;57(1):13–23.
132. Vercelli a, Mereuta OM, Garbossa D, et al. Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis.* 2008;31(3):395–405.
133. Zhao T, Li Y, Tang L, Li Y, Fan F, Jiang B. Protective effects of human umbilical cord blood stem cell intravitreal transplantation against optic nerve injury in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2011;249(7):1021–8.
134. Zwart I, Hill AJ, Al-Allaf F, et al. Umbilical cord blood mesenchymal stromal cells are neuroprotective and promote regeneration in a rat optic tract model. *Exp Neurol.* 2009;216(2):439–448.
135. Johnson T V, Bull ND, Hunt DP, Marina N, Tomarev SI, Martin KR. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(4):2051–9.
136. Johnson T V, DeKorver NW, Levasseur V a, et al. Identification of retinal ganglion cell neuroprotection conferred by platelet-derived growth factor through analysis of the mesenchymal stem cell secretome. *Brain.* 2014;137(Pt 2):503–19.
137. Roubex C, Godefroy D, Mias C, et al. Neuroprotection and intraocular pressure reduction conferred by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an animal model of glaucoma. *under Revis.* 2014;(434).

138. Gu S, Xing C, Han J, Tso MOM, Hong J. Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into corneal epithelial cells in vivo and ex vivo. *Mol Vis*. 2009;15(4):99–107.
139. Jiang T-S, Cai L, Ji W-Y, et al. Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. *Mol Vis*. 2010;16(7):1304–16.
140. Liu H, Zhang J, Liu C-Y, Hayashi Y, Kao WW-Y. Bone marrow mesenchymal stem cells can differentiate and assume corneal keratocyte phenotype. *J Cell Mol Med*. 2012;16(5):1114–24.
141. Liu H, Zhang J, Liu C-Y, et al. Cell therapy of congenital corneal diseases with umbilical mesenchymal stem cells: lumican null mice. *PLoS One*. 2010;5(5):e10707.
142. Polisetti N, Agarwal P, Khan I, Kondaiah P, Sangwan VS. Gene expression profile of epithelial cells and mesenchymal cells derived from limbal explant culture. 2010;(7):1227–1240.
143. Ainscough SL, Linn ML, Barnard Z, Schwab IR, Harkin DG. Effects of fibroblast origin and phenotype on the proliferative potential of limbal epithelial progenitor cells. *Exp Eye Res*. 2011;92(1):10–9.
144. Li G-G, Zhu Y-T, Xie H-T, Chen S-Y, Tseng SCG. Mesenchymal stem cells derived from human limbal niche cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(9):5686–97.
145. Joyce N, Harris D, Markov V. Potential of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells to heal damaged corneal endothelium. *Mol Vis*. 2012;(11):547–564.
146. Ma Y, Xu Y, Xiao Z, et al. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(2):315–21.
147. Oh JY, Kim MK, Shin MS, et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells*. 2008;26(4):1047–55.
148. Oh JY, Roddy GW, Choi H, et al. Anti-inflammatory protein TSG-6 reduces inflammatory damage to the cornea following chemical and mechanical injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(39):16875–80.
149. Roddy GW, Oh JY, Lee RH, et al. Action at a distance: systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF- α stimulated gene/protein 6. *Stem Cells*. 2011;29(10):1572–9.
150. Yao L, Li Z, Su W, et al. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. *PLoS One*. 2012;7(2):e30842.
151. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*. 2013;13(4):392–402.

152. Russo V, Young S, Hamilton A, Amsden BG, Flynn LE. Mesenchymal stem cell delivery strategies to promote cardiac regeneration following ischemic injury. *Biomaterials*. 2014;35(13):3956–74.
153. Da Costa MR, Pizzatti L, Lindoso RS, et al. Mechanisms of kidney repair by human mesenchymal stromal cells after ischemia: a comprehensive view using label-free MS(E). *Proteomics*. 2014;14(12):1480–93.
154. Eckert M a, Vu Q, Xie K, et al. Evidence for high translational potential of mesenchymal stromal cell therapy to improve recovery from ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(9):1322–34.
155. Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin. The fate of skin homograft transplanted to the brain, to subcutaneous tissue and to the anterior chamber 1947;(1942).
156. Jia Z, Jiao C, Zhao S, et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat corneal allograft rejection model. *Exp Eye Res*. 2012;102:44–9.
157. Oh JY, Lee RH, Yu JM, et al. Intravenous mesenchymal stem cells prevented rejection of allogeneic corneal transplants by aborting the early inflammatory response. *Mol Ther*. 2012;20(11):2143–52.
158. Baudouin C. [A new approach for better comprehension of diseases of the ocular surface]. *J Fr Ophtalmol*. 2007;30(3):239–246.
159. Wen L, Zhu M, Madigan MC, et al. Immunomodulatory effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on pro-inflammatory cytokine-stimulated human corneal epithelial cells. *PLoS One*. 2014;9(7):e101841.
160. Beyazyıldız E, Pınarlı FA, Beyazyıldız O, et al. Efficacy of topical mesenchymal stem cell therapy in the treatment of experimental dry eye syndrome model. *Stem Cells Int*. 2014;2014:250230.
161. Lee MJ, Ko AY, Ko JH, Lee HJ, Kim MK, Wee WR. Mesenchymal Stem/Stromal Cells Protect the Ocular Surface by Suppressing Inflammation in an Experimental Dry Eye. *Mol Ther*. 2014.
162. De Smet MD, Taylor SRJ, Bodaghi B, et al. Understanding uveitis: the impact of research on visual outcomes. *Prog Retin Eye Res*. 2011;30(6):452–70.
163. Servat JJ, Mears K a, Black EH, Huang JJ. Biological agents for the treatment of uveitis. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12(3):311–28.
164. Wang D, Li J, Zhang Y, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in active and refractory systemic lupus erythematosus: a multicenter clinical study. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(2):R79.

165. Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut*. 2011;60(6):788–98.
166. Liu Y, Mu R, Wang S, et al. Therapeutic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(6):R210.
167. Horai R, Caspi RR. Cytokines in autoimmune uveitis. *J Interferon Cytokine Res*. 2011;31(10):733–44.
168. Chen M, Copland D a, Zhao J, et al. Persistent inflammation subverts thrombospondin-1-induced regulation of retinal angiogenesis and is driven by CCR2 ligation. *Am J Pathol*. 2012;180(1):235–45.
169. Li G, Yuan L, Ren X, et al. The effect of mesenchymal stem cells on dynamic changes of T cell subsets in experimental autoimmune uveoretinitis. *Clin Exp Immunol*. 2013;173(1):28–37.
170. Zhang X, Ren X, Li G, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune uveoretinitis by comprehensive modulation of systemic autoimmunity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(6):3143–52.
171. Tasso R, Ilengo C, Quarto R, Cancedda R, Caspi RR, Pennesi G. Mesenchymal stem cells induce functionally active T-regulatory lymphocytes in a paracrine fashion and ameliorate experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(2):786–93.
172. Oh JY, Kim MK, Ko JH, Lee HJ, Lee JH, Wee WR. Rat allogeneic mesenchymal stem cells did not prolong the survival of corneal xenograft in a pig-to-rat model. *Vet Ophthalmol*. 2009;12 Suppl 1:35–40.
173. Sajic M, Hunt DPI, Lee W, et al. Mesenchymal stem cells lack efficacy in the treatment of experimental autoimmune neuritis despite in vitro inhibition of T-cell proliferation. *PLoS One*. 2012;7(2):e30708.
174. Ren G, Su J, Zhang L, et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells*. 2009;27(8):1954–62.
175. Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M, et al. Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation*. 2006;113(10):1311–25.
176. Alexopoulou L, Holt A, Medzhitov R, Flavell R. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;77(1985).
177. Mastri M, Shah Z, McLaughlin T, et al. Activation of Toll-like receptor 3 amplifies mesenchymal stem cell trophic factors and enhances therapeutic potency. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;303(10):C1021–33.

178. Schioppa T, Uranchimeg B, Sacconi A, et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med*. 2003;198(9):1391–402.
179. Kim YS, Noh MY, Kim JY, et al. Direct GSK-3 β inhibition enhances mesenchymal stromal cell migration by increasing expression of beta-PIX and CXCR4. *Mol Neurobiol*. 2013;47(2):811–20.
180. Tang Y, Cai B, Yuan F, et al. Melatonin pretreatment improves the survival and function of transplanted mesenchymal stem cells after focal cerebral ischemia. *Cell Transplant*. 2014;23(10):1279–91.
181. Yip H-K, Chang Y-C, Wallace CG, et al. Melatonin treatment improves adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for acute lung ischemia-reperfusion injury. *J Pineal Res*. 2013;54(2):207–21.
182. Mangi A a, Noiseux N, Kong D, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med*. 2003;9(9):1195–201.
183. Gneocchi M, He H, Noiseux N, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J*. 2006;20(6):661–9.
184. Harper MM, Grozdanic SD, Blits B, et al. Transplantation of BDNF-secreting mesenchymal stem cells provides neuroprotection in chronically hypertensive rat eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(7):4506–15.
185. Hofmann S, Hagenmüller H, Koch AM, et al. Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. *Biomaterials*. 2007;28(6):1152–62.
186. Kofidis T, Lebl DR, Martinez EC, Hoyt G, Tanaka M, Robbins RC. Novel injectable bioartificial tissue facilitates targeted, less invasive, large-scale tissue restoration on the beating heart after myocardial injury. *Circulation*. 2005;112(9 Suppl):I173–7.
187. Chan BP, Hui TY, Yeung CW, Li J, Mo I, Chan GCF. Self-assembled collagen-human mesenchymal stem cell microspheres for regenerative medicine. *Biomaterials*. 2007;28(31):4652–66.
188. Trouche E, Girod Fullana S, Mias C, et al. Evaluation of alginate microspheres for mesenchymal stem cell engraftment on solid organ. *Cell Transplant*. 2010;19(12):1623–33.
189. Wei H-J, Chen C-H, Lee W-Y, et al. Bioengineered cardiac patch constructed from multilayered mesenchymal stem cells for myocardial repair. *Biomaterials*. 2008;29(26):3547–56.
190. Johnson T V, DeKorver NW, Levasseur V a, et al. Identification of retinal ganglion cell neuroprotection conferred by platelet-derived growth factor through analysis of the mesenchymal stem cell secretome. *Brain*. 2014;137(Pt 2):503–19.

191. Hu Y, Tan HB, Wang XM, Rong H, Cui HP, Cui H. Bone marrow mesenchymal stem cells protect against retinal ganglion cell loss in aged rats with glaucoma. *Clin Interv Aging*. 2013;8:1467–70.
192. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*. 2007;25(11):2896–902.
193. Calió ML, Marinho DS, Ko GM, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells decreases oxidative stress, apoptosis, and hippocampal damage in brain of a spontaneous stroke model. *Free Radic Biol Med*. 2014;70:141–54.
194. Uccelli A, Laroni A, Freedman MS. Mesenchymal stem cells as treatment for MS - progress to date. *Mult Scler*. 2013;19(5):515–9.
195. Cui B, Li E, Yang B, Wang B. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of spinal cord injury. *Exp Ther Med*. 2014;7(5):1233–1236.
196. Izzotti A, Saccà SC, Longobardi M, Cartiglia C. Sensitivity of ocular anterior chamber tissues to oxidative damage and its relevance to the pathogenesis of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(11):5251–8.
197. Baudouin C, Denoyer A, Desbenoit N, Hamm G. In vitro and in vivo experimental studies on trabecular meshwork degeneration induced by benzalkonium chloride. *An Am Ophthalmol Soc thesis*. 2012:40–63.
198. Picht G, Welge-Luessen U, Grehn F, Lütjen-Drecoll E. Transforming growth factor β 2 levels in the aqueous humor in different types of glaucoma and the relation to filtering bleb development. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2001;239(3):199–207.
199. Inatani M, Tanihara H, Katsuta H, Honjo M, Kido N, Honda Y. Transforming growth factor- β 2 levels in aqueous humor of glaucomatous eyes. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2001;239(2):109–113.
200. Yücel Y. Central nervous system changes in glaucoma. *J Glaucoma*. 2013; (7);22 Suppl 5:S24-5
201. Tzameret A, Sher I, Belkin M, et al. Transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cells as a thin subretinal layer ameliorates retinal degeneration in a rat model of retinal dystrophy. *Exp Eye Res*. 2014;118:135–44.
202. Denoyer A, Godefroy D, Célériér I, et al. CXCR3 antagonism of SDF-1(5-67) restores trabecular function and prevents retinal neurodegeneration in a rat model of ocular hypertension. *PLoS One*. 2012;7(6):e37873.
203. Fuchs C, Forster V, Balse E, Sahel J-A, Picaud S, Tessier L-H. Retinal-cell-conditioned medium prevents TNF-alpha-induced apoptosis of purified ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(8):2983–91.

204. Danias J, Shen F, Kavalarakis M, et al. Characterization of retinal damage in the episcleral vein cauterization rat glaucoma model. *Exp Eye Res.* 2006;82(2):219–28.
205. Takahashi E, Inoue T, Fujimoto T, Kojima S, Tanihara H. Epithelial mesenchymal transition-like phenomenon in trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res.* 2014;118:72–9.
206. Friedenstein A. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976. Sep;4(5):267-74.
207. Choi Y-H, Kurtz A, Stamm C. Mesenchymal stem cells for cardiac cell therapy. *Hum Gene Ther.* 2011;22(1):3–17.
208. Li F, Zhao S-Z. Mesenchymal stem cells: Potential role in corneal wound repair and transplantation. *World J Stem Cells.* 2014;6(3):296–304.
209. Inoue Y, Iriyama A, Ueno S, et al. Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration. *Exp Eye Res.* 2007;85(2):234–41.
210. Rao P, Deng P, Sasaki Y, Epstein D. Regulation of myosin light chain phosphorylation in the trabecular meshwork: role in aqueous humour outflow facility. *Exp Eye Res.* 2005;80:197–206.
211. Pattabiraman PP, Lih FB, Tomer KB, Rao PV. The role of calcium-independent phospholipase A2 γ in modulation of aqueous humor drainage and Ca²⁺ sensitization of trabecular meshwork contraction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012;302(7):C979–91.
212. Zhao T, Li Y, Tang L, Li Y, Fan F, Jiang B. Protective effects of human umbilical cord blood stem cell intravitreal transplantation against optic nerve injury in rats. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology.* 2011;249(7):1021-8
213. Zwart I, Hill AJ, Al-Allaf F, Shah M. Umbilical cord blood mesenchymal stromal cells are neuroprotective and promote regeneration in a rat optic tract model. *Exp Neurol.* 2009;216(2):439-48.
214. Kwong JMK, Vo N, Quan A, et al. The dark phase intraocular pressure elevation and retinal ganglion cell degeneration in a rat model of experimental glaucoma. *Exp Eye Res.* 2013;112:21–8.
215. Gupta N, Yücel YH. Should we treat the brain in glaucoma? *Can J Ophthalmol.* 2007;42(3):409–413.
216. Gupta N. Glaucoma of the brain: a disease model for the study of transsynaptic neural degeneration. *Acta Ophthalmol.* 2011;89.
217. Yu D-Y, Cringle SJ, Balaratnasingam C, Morgan WH, Yu PK, Su E-N. Retinal ganglion cells: Energetics, compartmentation, axonal transport, cytoskeletons and vulnerability. *Prog Retin Eye Res.* 2013;36:217–46.

218. Urcola JH, Hernández M, Vecino E. Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp Eye Res.* 2006;83(2):429–37.
219. Li H-Y, Ruan Y-W, Ren C-R, Cui Q, So K-F. Mechanisms of secondary degeneration after partial optic nerve transection. *Neural Regen Res.* 2014;9(6):565–74.
220. Moreno M, Campanelli J, Sande P. Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure. *Free Radic Biol.* 2004; 15;37(6):803-12
221. Miljanović B, Dana R, Sullivan D a, Schaumberg D a. Impact of dry eye syndrome on vision-related quality of life. *Am J Ophthalmol.* 2007;143(3):409–15.
222. Shachar I, Haran M. The secret second life of an innocent chaperone: the story of CD74 and B cell/chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Leuk Lymphoma.* 2011.
223. Pisella P, Jean MD Saint, Goldschild M, Goguel A, Baudouin C. Flow Cytometric Analysis of Inflammatory Markers in KCS : 6-Month Treatment with Topical Cyclosporin A . *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(1):90-5
224. Meyer-Siegler KL, Iczkowski K a, Leng L, Bucala R, Vera PL. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD74) attenuates growth and invasion of DU-145 prostate cancer cells. *J Immunol.* 2006;177(12):8730–9.
225. Tillmann S, Bernhagen J, Noels H. Arrest Functions of the MIF Ligand/Receptor Axes in Atherogenesis. *Front Immunol.* 2013;4(May):115.
226. Gregory JL, Morand EF, McKeown SJ, et al. Macrophage migration inhibitory factor induces macrophage recruitment via CC chemokine ligand 2. *J Immunol.* 2006;177(11):8072–9.
227. Zuk P, Zhu M, Ashjian P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13(12):4279–4295.
228. Erices A, Conget P, Minguell J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 2000.
229. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U SA.* 2000;97(25).
230. Bianco P, Cao X, Frenette PS, et al. The meaning, the sense and the significance: Translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med.* 2013;19(1):35–42.
231. Caplan AI. What's in a name? *Tissue Eng Part A.* 2010;16(8):2415–7.
232. Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008;26(9):2287–99.

233. McLaren A. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature*. 2001;414(11):129–131.
234. Yamamoto M, Cui L, Johkura K, et al. Branching ducts similar to mesonephric ducts or ureteric buds in teratomas originating from mouse embryonic stem cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;290(1):F52–60.
235. Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, et al. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS One*. 2012;7(10):e47559.
236. Røsland GV, Svendsen A, Torsvik A, et al. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res*. 2009;69(13):5331–9.
237. Rubio D, Garcia-castro J, Martín MC, et al. Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation. *Cancer Res*. 2005;3035–3039.
238. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res*. 2007;67(19):9142–9.
239. Sensebé L, Tarte K, Galipeau J, et al. Limited acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stromal cells. *Cell Stem Cell*. 2012;10(1):9–10.
240. Ben-David U, Mayshar Y, Benvenisty N. Large-scale analysis reveals acquisition of lineage-specific chromosomal aberrations in human adult stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011;9(2):97–102.
241. Tarte K, Gaillard J, Lataillade J-J, et al. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*. 2010;115(8):1549–53.
242. Sensebé L. Beyond genetic stability of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2013;15(11):1307–8.
243. Serakinci N, Guldberg P, Burns JS, et al. Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene*. 2004;23(29):5095–8.
244. Spees JL, Gregory C a, Singh H, et al. Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol Ther*. 2004;9(5):747–56.
245. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(13):8932–7.

246. Shahdadfar A, Frønsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells*. 2005;23(9):1357–66.
247. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*. 2005;205(2):228–36.
248. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*. 2007;47(8):1436–46.
249. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003;75(3):389–97.
250. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002;30(1):42–48.
251. Liechty K, MacKenzie T, Shaaban A. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*. 2000;6(11).
252. Zangi L, Margalit R, Reich-Zeliger S, et al. Direct imaging of immune rejection and memory induction by allogeneic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*. 2009;27(11):2865–74.
253. Ankrum J a, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol*. 2014;32(3):252–60.
254. Caspi RR. A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest*. 2010;120(9):3073-83.
255. Yujing B, Yingting Z, Qin C, Jing X. Validation of glaucoma-like features in the rat episcleral vein cauterization model. *Chinese Med*. 2014;127(12):359–364.
256. Touchard E, Kowalczyk L. The ciliary smooth muscle electrotransfer: basic principles and potential for sustained intraocular production of therapeutic proteins. *J gene Med*. 2010;(6):904–919.
257. El Sanharawi M, Touchard E, Benard R, et al. Long-term efficacy of ciliary muscle gene transfer of three sFlt-1 variants in a rat model of laser-induced choroidal neovascularization. *Gene Ther*. 2013;20(11):1093–103.
258. Bassi G, Guilloton F, Menard C, et al. Effects of a ceramic biomaterial on immune modulatory properties and differentiation potential of human mesenchymal stromal cells of different origin. *Tissue Eng Part A*. 2014.

259. Kumar MM, Eunice W, Ann ME. BMP-2 and BMP-9 promote chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcome the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol.* 2001;284(May):275–284.
260. Felka T, Schäfer R, Schewe B, Benz K, Aicher WK. Hypoxia reduces the inhibitory effect of IL-1 β on chondrogenic differentiation of FCS-free expanded MSC. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17(10):1368–76.
261. Yu K-R, Yang S-R, Jung J-W, et al. CD49f enhances multipotency and maintains stemness through the direct regulation of OCT4 and SOX2. *Stem Cells.* 2012;30(5):876–87.
262. Froger N, Cadetti L, Lorach H, et al. Taurine provides neuroprotection against retinal ganglion cell degeneration. *PLoS One.* 2012;7(10):e42017.
263. Luna C, Li G, Huang J, et al. Regulation of trabecular meshwork cell contraction and intraocular pressure by miR-200c. *PLoS One.* 2012;7(12):e51688.
264. EMA. *Guideline on the risk-based approach according to annex I , part IV of Directive 2001 / 83 / EC applied to Advanced therapy medicinal products Guideline on the risk-based approach according to annex I , part IV of Directive 2001 / 83 / EC for ATMPs Table.;* 2013.
265. Xue Z, Wu X, Liu Y, et al. Mesenchymal Stem Cells Promote Epithelial to Mesenchymal Transition and Metastasis in Gastric Cancer through Paracrine Cues and Close Physical Contact. *J Cell Biochem.* 2014;(11).
266. Djouad F, Plence P, Bony C, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood.* 2003;102(10):3837–44.
267. Bouchez G, Sensebé L, Vourc'h P, et al. Partial recovery of dopaminergic pathway after graft of adult mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson's disease. *Neurochem Int.* 2008;52(7):1332–42.
268. Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, et al. Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood.* 2004;103(9):3313–9.
269. Gholamrezanezhad A, Mirpour S, Bagheri M, et al. In vivo tracking of ¹¹¹In-oxine labeled mesenchymal stem cells following infusion in patients with advanced cirrhosis. *Nucl Med Biol.* 2011;38(7):961–7.
270. Vilalta M, Dégano IR, Bagó J, et al. Biodistribution, long-term survival, and safety of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells transplanted in nude mice by high sensitivity non-invasive bioluminescence imaging. *Stem Cells Dev.* 2008;17(5):993–1003.
271. Sensebé L, Fleury-Cappellesso S. Biodistribution of mesenchymal stem/stromal cells in a preclinical setting. *Stem Cells Int.* 2013;2013(1394):678063.

- 272. Toupet K, Maumus M, Peyrafitte J-A, et al. Long-term detection of human adipose-derived mesenchymal stem cells after intraarticular injection in SCID mice. *Arthritis Rheum.* 2013;65(7):1786–94.
- 273. Phinney DG, Galipeau J, Krampera M, Martin I, Shi Y, Sensebe L. MSCs: science and trials. *Nat Med.* 2013;19(7):812.
- 274. Fibbe WE, Dazzi F, LeBlanc K. MSCs: science and trials. *Nat Med.* 2013;19(7):812–3.
- 275. Wang D, Zhang H, Liang J, Li X. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus: 4 years of experience. *Cell Transplant.* 2013. Available at:
- 276. Bianco P. Reply to MSCs: science and trials. *Nat Med.* 2013;19(7):813–4.
- 277. Sahel J-A, Roska B. Gene therapy for blindness. *Annu Rev Neurosci.* 2013;36:467–88.